

Aus der Abteilung
für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Prof. Dr. Dr. med. Lukas Prantl
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Der Einfluss von Störungen des mTOR-Signalweges auf die Pathophysiologie bei Morbus Madelung

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Teresa Angela Schön

2018

Aus der Abteilung
für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Prof. Dr. Dr. med. Lukas Prantl
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Der Einfluss von Störungen des mTOR-Signalweges auf die Pathophysiologie bei Morbus Madelung

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Teresa Angela Schön

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. med. Lukas Prantl
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Stephan Schreml
Tag der mündlichen Prüfung:	15.05.2018

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis.....	3
2.	Einleitung.....	5
2.1	Morbus Madelung.....	5
2.2	Stammzellen.....	8
2.3	Adipogene Stammzellen.....	10
2.4	Die Rolle adrenerg stimulierter Lipolyse bei Morbus Madelung.....	12
2.5	Mögliche Herkunft aus braunem Fettgewebe.....	14
2.6	Der mTOR-Signalweg.....	16
2.7	Das Immunsuppressivum Rapamycin.....	17
3.	Zielsetzung.....	19
4.	Material und Methoden.....	21
4.1	Isolation von humanen adipogenen Stammzellen aus Fettgewebe.....	21
4.2	Zellkultur und Passagieren.....	22
4.3	Kryokonservierung von Stammzellen.....	24
4.4	Adipogene Differenzierung.....	24
4.5	Vitalitätstests mit Resazurin.....	25
4.6	Durchflusszytometrie (FACS).....	26
4.7	Isolation von RNA aus adipogenen Stammzellen.....	27
4.8	Reverse Transkription.....	29
4.9	Polymerasekettenreaktion.....	29
4.10	Oil Red Färbung und Quantifizierung des Farbstoffes.....	31
4.11	Lipolyse-Assay.....	32
5.	Ergebnisse.....	35
5.1	Vitalitätstests mit Resazurin.....	35
5.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	38
5.3	PCR.....	43
5.3.1	EIF4EBP1.....	43
5.3.2	RPS6K1.....	46
5.3.3	mTOR.....	49
5.4	Oil Red Färbung.....	51
5.5	Lipolyse-Assay.....	55
6.	Diskussion.....	59
6.1	Vitalitätstests mit Resazurin.....	59
6.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	60
6.3	PCR.....	61
6.3.1	EIF4EBP1.....	61
6.3.2	RPS6K1.....	62
6.3.3	mTOR.....	63
6.4	Oil Red Färbung.....	64
6.5	Lipolyse-Assay.....	65
7.	Schlussfolgerung.....	67

8. Literaturverzeichnis.....	68
9. Materialienverzeichnis.....	75
9.1 Einwegmaterialien.....	75
9.2 Chemikalien.....	75
9.3 Kits.....	76
9.4 Geräte.....	76
10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	77
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	77
10.2 Tabellenverzeichnis.....	77
11. Abkürzungsverzeichnis.....	78
12. Lebenslauf.....	79
13. Danksagung.....	81
14. Erklärung.....	82

2. Einleitung

2.1 Morbus Madelung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Krankheitsbild der Multiplen Symmetrischen Lipomatose, auch Morbus Madelung genannt, welche mit einer Inzidenz von ungefähr 1:25000 zu den selteneren Erkrankungen zählt. Sie wurde erstmals 1846 von Sir Benjamin Brodie beschrieben, der über zwei Patienten mit symmetrisch verteilten Fettgewebswucherungen im Nackenbereich berichtete (Brodie, 1846). Über 40 Jahre später beschrieb Madelung 1888 drei weitere typische Fälle und 1898 führten Launois und Bensaude die Bezeichnung „Benigne symmetrische Lipomatose“ ein, nachdem sie eine weitere Reihe von Fällen diagnostiziert hatten (Madelung, 1888; Launois, Bensaude, 1898). Bei den Patienten kommt es zu diffusen, symmetrisch verteilten Fettgewebswucherungen, wobei sich anhand des Verteilungsmusters vier verschiedene Typen abgrenzen lassen (Abb. 1). Beim klassischen Madelung-Fetthals findet sich das überschüssige Fettgewebe im Bereich des Halses und des Nackens, beim sogenannten pseudoathletischen Typ ist vor allem die Schulterregion betroffen, beim gynäkoiden Typ vorrangig der Beckengürtelbereich und beim abdominellen Typ die Rumpfregeion (Donhauser et. al.,1991). Allerdings gibt es von allen Typen auch Übergangs- und Mischformen, die sich jedoch stets beidseitig symmetrisch verteilen, wodurch sie sich von echten Lipomen abgrenzen lassen. Ein weiterer Unterschied besteht auch darin, dass sich die Fettgewebswucherungen im Gegensatz zu echten Lipomen nur unscharf von der Umgebung abgrenzen lassen, nur gelegentlich findet sich eine Art Pseudokapsel (Moritsch, 2004).

Die Ursache dieser Erkrankung ist bis heute weitestgehend ungeklärt, wobei sich bei einem gewissen Anteil der Betroffenen ein gesteigerter bis exzessiver Alkoholabusus findet (Moritsch, 2004). Auch stellte sich in einer Langzeitstudie, in die 31 Patienten von 1973 bis 1992 aufgenommen und bis 1998/1999 beobachtet wurden, heraus, dass Alkoholabstinenz zu einer leichten Regression des lipomatösen Gewebes führt, wohingegen gesteigerter Alkoholkonsum den Krankheitsverlauf zu beschleunigen scheint. Alkohol könnte also als eine Art Triggersubstanz eine Rolle im Krankheitsverlauf spielen (Enzi et al., 2002). Jedoch lässt die Tatsache, dass sich bei einigen Patienten eine familiäre Häufung des Krankheitsbildes findet, darauf schließen, dass auch genetische Faktoren eine Rolle spielen könnten (Michon, 1936; Kurzweg, Spencer, 1951). In diesem Zusammenhang wird ein autosomal-dominanter Erbgang als mögliche Ursache vermutet (McKusik, 1978). Häufig geht Morbus Madelung

aber auch mit anderen Störungen und Krankheitsbildern einher, wie Hyperurikämie, Hyperthyreodismus, Hypertension, Hyperlipidämie, Lebererkrankungen und Störungen im Bereich des Glukosestoffwechsels (Sia et al., 2012; Ko et al., 2010).

1)



2)



3)



4)



Abbildung 1: Fotos von Patienten mit den unterschiedlichen Subtypen des Morbus Madelon vom Universitätsklinikum Regensburg aus den Abteilungen der Plastischen, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und der Dermatologie. 1) = klassischer Madelon-Fetthals; 2) = pseudoathletischer Typ; 3) = gynäkoider Typ; 4) = abdominaler Typ

Das Hauptmanifestationsalter liegt im Bereich von 35-60 Jahren und bislang existiert keine kausale Therapie für diese Patienten. Da die Erkrankung jedoch progredient fortschreitet und nicht spontan reversibel ist, liegt der Goldstandard derzeit in der chirurgischen Resektion des überschüssigen Fettgewebes sowie der Liposuktion. Dies kann aufgrund von Kompressionserscheinungen in weiter fortgeschrittenen Stadien medizinisch indiziert sein, vor allem in der Hals-Nacken-Region im Bereich größerer Gefäße. Aber auch eine zunehmende Bewegungseinschränkung in dieser Region oder Kompressionserscheinungen im Bereich von Nerven, Nackenmuskulatur und des Mediastinums können Indikationen für operative Eingriffe darstellen. In weit fortgeschrittenen Stadien kann es auch zur Obstruktionen von Ösophagus und Trachea kommen, was zum Einen die oberen Atemwege komprimiert, zum Anderen ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom verursachen kann (Esteban-Julvez et al., 2013; Milisavljevic et al., 2010). Meist erfolgt die Resektion jedoch aus kosmetischen Gründen bereits in früheren Stadien.

Allerdings wurden nach solchen Eingriffen in der Vergangenheit häufig Rezidive beobachtet (Hadjiev et al., 2010). Hinzu kommt, dass eine Operation an sich als invasiver Eingriff immer ein gewisses Risiko in sich birgt und gerade im Hals-Nacken-Bereich empfindliche Strukturen wie die Karotisscheide, der N. facialis und die Speicheldrüsen geschont werden müssen (Mortisch, 2004). Außerdem wurde bei einigen Patienten mit MSL ohne kardiale Vorerkrankungen vom Auftreten des plötzlichen Herztodes berichtet (Enzi et al, 2002; Fonseca et al, 2012). In Zukunft wäre es daher wünschenswert, dieses Krankheitsbild nicht nur chirurgisch, sondern auch kausal therapieren zu können, beispielsweise in Form von Medikamentenapplikationen.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte mit Hilfe von Microarrays bereits gezeigt werden, dass im betroffenen Gewebe von Patienten mit Morbus Madelung im Vergleich zum unbetroffenen Gewebe Gene des mTOR-Signalweges differentiell reguliert sind. Ein Inhibitor dieser Signaltransduktionskaskade ist das aktuell häufig als Immunsuppressivum eingesetzte Rapamycin. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb im Bereich der Grundlagenforschung herauszufinden, wie sich aus Madelunggewebe isolierte Stammzellen nach Behandlung mit Rapamycin verhalten. Um aussagekräftige Vergleiche ziehen zu können, wurden hierzu jeweils Zellen sowohl aus gesundem als auch aus betroffenem Gewebe eines Patienten behandelt.

2.2 Stammzellen

Bei Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte Zellen, die einerseits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und andererseits in der Lage sind, Progenitorzellen zu bilden, welche sich unter bestimmten Bedingungen zu funktionellem Gewebe differenzieren können (Beckmann et al., 2007).

Die Selbsterneuerung einer Stammzelle geschieht, wenn sie sich entweder symmetrisch oder asymmetrisch teilt (Abb. 2). Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Tochterzellen, welche dieselben Eigenschaften besitzen wie die Ausgangszelle, während bei der asymmetrischen Teilung nur eine identische Tochterzelle entsteht. Die Zweite kann sich als Progenitorzelle zu einer funktionell ausgereiften Körperzelle entwickeln (Morrison, Kimble, 2006).

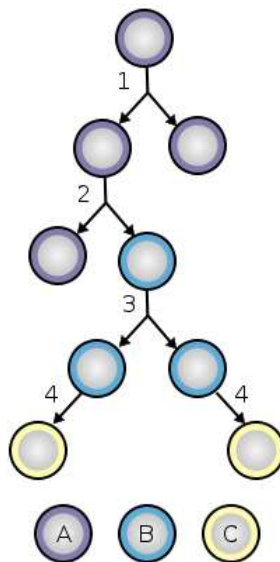


Abbildung 2: Zellteilung und Differenzierung von Stammzellen. A = Stammzelle; B = Progenitorzelle; C = differenzierte Zelle; 1 = symmetrische Zellteilung; 2 = asymmetrische Zellteilung; 3 = Progenitor- zellteilung; 4 = terminale Differenzierung (Abbildung von https://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell)

Sobald der Grad der Differenzierung der Zellen steigt, verlieren sie auch an Potenz im Bezug auf die Vielfalt ihrer Entwicklungsmöglichkeiten. Totipotenz besitzen nur die Zygote und die Zellen ihrer unmittelbar folgenden Teilungsstadien bis hin zum Morulastadium. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit sowohl einen gesamten Embryo mit all seinen spezialisierten, lebensnotwendigen Körpergeweben zu entwickeln als auch extraembryonales Gewebe zu bilden, welches zunächst in Form von Trophoblasten die Blastozyste umgibt und später den fetalen Teil der Plazenta bildet (Mitalipov, Wolf, 2009). Mit steigendem Differenzierungsgrad verlieren die Zellen ihre Totipotenz (Abb. 3). So ist die innere Zellmasse (ICM) des Embryo nur noch als pluripotent zu bezeichnen, was bedeutet, dass sich diese Zellen immer noch in jedes Gewebe der drei Keimblätter, Endoderm, Mesoderm und Ektoderm, differenzieren können, jedoch nicht mehr in der Lage sind einen kompletten Embryo und extraembryonales Gewebe zu bilden. Im weiteren Verlauf sind die Zellen nur noch als multipotent zu bezeichnen. Diesem Grad der Differenzierung sind viele Progenitorzellen zuzuordnen, welche sich nur noch in eine begrenzte Anzahl an verschiedenen Zelltypen innerhalb ihres Keimblattes entwickeln können. Hierzu zählen beispielsweise neuronale oder hämatopoetische Stammzellen (Mitalipov, Wolf, 2009).

Anhand ihrer Herkunft und ihres Spektrums an Differenzierungsmöglichkeiten lassen sich zwei Arten von Stammzellen unterscheiden, embryonale Stammzellen (ESCs) und somatische Stammzellen (SSCs). ESCs leiten sich von der frühen Blastozyste und der inneren Zellmasse des Embryos ab und sind in der Lage sich in alle drei Keimblätter - Mesoderm, Ektoderm und Endoderm - zu differenzieren, weshalb sie als pluripotent bezeichnet werden können. SSCs hingegen können nach der Gastrulation aus fetalem oder auch aus adultem Gewebe isoliert werden und sind darauf ausgelegt sich zu reifen Zellen ihres Ausgangsgewebes zu entwickeln (Wislet-Gendebien et al., 2005). Allerdings konnte in zahlreichen aktuellen Arbeiten gezeigt werden, dass sich auch Stammzellen aus adultem Gewebe unter den richtigen Bedingungen in vitro und in vivo in verschiedene andere Gewebearten differenzieren lassen und dabei auch Gewebe eines anderen Keimblattes bilden können (Kopen et al., 1999; Brazelton et al., 2000; Alvarez-Dolado et al., 2003; Beltrami et al., 2001; Gussoni et al., 1999; Kotton, Fine, 2003; Petersen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997; Terskikh, 2001).

Adipogene Stammzellen (ASCs), auf die im nächsten Abschnitt im Detail eingegangen wird, sind den adulten gewebsspezifischen Stammzellen zuzuordnen. In Bezug auf ihre Potenz haben aktuelle Arbeiten auch hier gezeigt, dass sie die Fähigkeit besitzen, Gewebe eines anderen Keimblattes zu bilden. So ist es gelungen ASCs, welche mesodermalen Ursprungs sind, zu neuronalen Vorläuferzellen zu differenzieren (Ashjian et al., 2003). Da sich

neuronales Gewebe aus dem Ektoderm entwickelt, konnte somit bei diesen adulten Stammzellen nachgewiesen werden, dass ihr Differenzierungspotential über ihr Ursprungsgewebe hinausreicht.

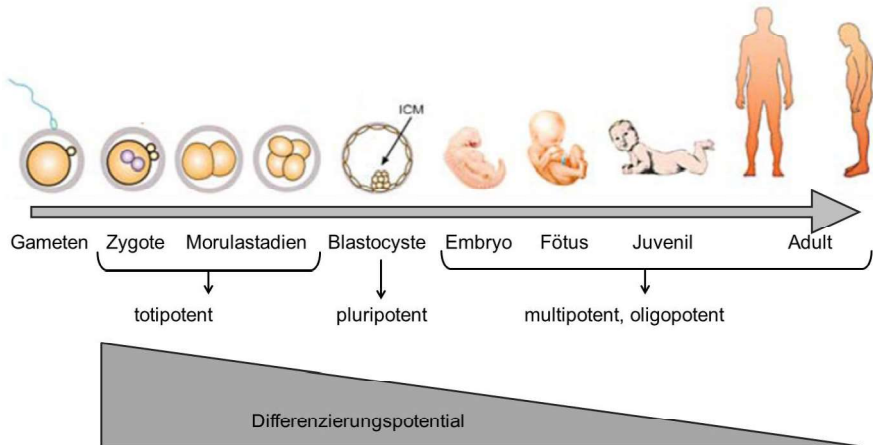


Abbildung 3: Das Differenzierungspotential von Stammzellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Mit fortschreitender Entwicklung verlieren die Stammzellen an Potenz hinsichtlich ihrer Differenzierungsmöglichkeiten (Felthaus, 2014, verändert nach Mitalipov and Wolf, 2009).

2.3 Adipogene Stammzellen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich adipogene Stammzellen verwendet, die im Rahmen elektiver operativer Eingriffe direkt aus erkrankten und nicht-erkrankten Körperregionen von Madelungpatienten gewonnen wurden, um einen direkten Vergleich zwischen betroffenem und unbetroffenem Gewebe ziehen zu können. Aktuell rückt Fettgewebe als verlässliche Quelle für Stammzellen immer stärker in den Fokus von Wissenschaft und Medizin, da es meist im Überschuss vorhanden und leicht zugänglich ist. Gerade im Bereich der regenerativen Medizin wächst das Interesse an Stammzellen derzeit stetig, allerdings müssen bei der Auswahl dieser eine Reihe von Faktoren berücksichtigt werden. Sie sollten im Überschuss vorhanden sein, mit minimalinvasiven Methoden zugänglich sein und sich entlang verschiedener Differenzierungswege in unterschiedliche Arten von Gewebe

entwickeln können. Schließlich sollten sie noch möglichst sicher und effektiv entweder dem Spender selbst oder einem kompatiblen Empfänger transplantiert werden können (Gimble, 2003). Da ASCs eine Reihe dieser Kriterien vollständig oder zumindest teilweise erfüllen, dürften sie auch zukünftig noch ein bedeutendes Forschungsgebiet darstellen.

Bislang haben sich viele Arbeiten zu adulten Stammzellen auf mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Stroma des Knochenmarks konzentriert (Zuk et al., 2002). Aber auch aus Fettgewebe lassen sich MSCs, die ihren Namen aufgrund ihrer Bedeutung bei der Entwicklung mesenchymaler Gewebe bei der Embryogenese erhalten haben (Caplan, 1991), isolieren. Die internationale Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT, International Society for Cellular Therapy) hat bestimmte Minimalkriterien definiert, um MSCs einheitlicher charakterisieren zu können: MSCs sind unter standardisierten Zellkulturbedingungen plastikadhärent und exprimieren die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90, wohingegen sie negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR-Marker sind. Außerdem lassen sie sich *in vitro* zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren (Dominici et al., 2006).

ASCs kommen als gewebsspezifische Stammzellen im adulten Organismus vor, auch wenn sie hier nur eine eher seltene Population darstellen (Woodbury et al., 2002). Allerdings sind adulte Stammzellen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht mehr pluripotent, was bedeutet, dass diese immer noch ein relativ breites Spektrum an Differenzierungsmöglichkeiten besitzen, allerdings ihr Entwicklungspotential deutlich eingeschränkter ist als das von embryonalen Stammzellen (Bunnell et al., 2008). Ursprünglich ist man davon ausgegangen, dass adulte Stammzellen sich nur in ihr Herkunftsgewebe differenzieren können. Diese These konnte allerdings in mehreren aktuellen Studien widerlegt werden, in denen gezeigt werden konnte, dass sich auch adulte Stammzellen in Gewebe ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Ursprungs differenzieren können (Beltrami et al., 2001; Gussoni et al., 1999; Kotton, Fine, 2003; Petersen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997; Terskikh, 2001). So lassen sich aus adultem Fettgewebe isolierte Stromazellen, welche bereits einen Präadipozyten-Charakter besitzen, *in vitro* einerseits zu Fettgewebszellen, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren, andererseits besitzen sie aber auch die Fähigkeit sich in Myoblasten und in neurogenes Gewebe zu entwickeln, wenn sie durch entsprechende Signale hierzu stimuliert werden (Deslex et al., 1987; Hauner et al., 1989; Zuk et al., 2002; Guilak et al., 2006; Gimble, Guilak, 2003). Somit besitzen ASCs ein großes Potential, auch wenn sie nicht an die Pluripotenz embryonaler Stammzellen heranreichen. Da deren Verwendung allerdings zahlreiche ethische Probleme mit sich bringt,

bieten sich MSCs aus Knochenmark oder Fettgewebe als gute und ethisch unbedenkliche Alternative an.

Um der Fragestellung nachzugehen, in wie weit sich ASCs von MSCs aus Knochenmark unterscheiden, haben Zuk et al. die Expression bestimmter Proteine und CD-Oberflächenmarker untersucht, welche spezifisch für BM-MSCs (bone marrow-MSCs) sind (Bruder et al., 1998; Conget, Minguell, 1999; Pittenger et al., 1999). Hierbei hat sich mittels Durchflusszytometrie ergeben, dass die aus Lipoaspirat isolierten Zellen ebenso wie BM-MSCs die Oberflächenmarker CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 exprimiert haben, während sie negativ für CD31 und CD45 waren. Des Weiteren konnte CD13 bei den adipogenen Zellen nachgewiesen werden, wohingegen sie CD14, CD16, CD56, CD62e und CD104 nicht exprimiert hatten (Zuk et al., 2002). Insgesamt konnten nur zwei Abweichungen bei den CD-Oberflächenmarkern gefunden werden, zum einen waren die Zellen aus Lipoaspirat im Gegensatz zu BM-MSCs positiv für CD49d und zum anderen negativ für CD106, einem Marker, der auf MSCs aus dem Knochenmark exprimiert wird und funktionell mit der Hämatopoese assoziiert ist (Levesque et al., 2001). Da adipogenes Gewebe hierzu in keinem Zusammenhang steht, lässt sich das Fehlen dieses Markers gut erklären. Die Tatsache, dass sich die aus Lipoaspirat isolierten Zellen ansonsten bezüglich ihrer Oberflächenmarkerexpression kaum von BM-MSCs unterscheiden, bestätigt, dass es sich hierbei um Zellen mit Stammzellcharakter handelt und hebt erneut hervor, dass die leicht zugänglichen und im Überschuss vorhandenen ASCs in Zukunft in der Stammzellforschung von großer Bedeutung sein dürften.

2.4 Die Rolle adrenerg stimulierter Lipolyse bei Morbus Madelung

Zum Krankheitsbild des Morbus Madelung gibt es bereits einige Vorarbeiten, unter anderem von einer Arbeitsgruppe um Guliano Enzi. Deren Ergebnissen nach könnte eine Störung der durch Katecholamine induzierten Lipolyse als mögliche Ursache für die Pathophysiologie bei Morbus Madelung in Frage kommen.

Die Lipolyse in den Adipozyten kann auf unterschiedliche Wege induziert werden. Einerseits ist dies direkt über den intrazellulären Second Messenger cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) möglich, welcher über eine Signalkaskade schließlich die Hormonsensitive Lipase, ein Schlüsselenzym der Lipolyse, aktiviert. Andererseits kann die

Induktion auch extrazellulär durch Katecholamine über den β -Adrenozeptor erfolgen, wodurch wiederum die Produktion von intrazellulärem cAMP gesteigert wird. In der Studie von Guliano Enzi wurde sowohl betroffenes als auch unbetroffenes Gewebe von zehn Patienten untersucht, wobei sich ergeben hat, dass der direkte intrazelluläre Weg der Lipolyseinduktion über cAMP bei Zellen aus betroffenem Gewebe ähnlich hohe Lipolyseraten hervorruft wie bei denjenigen aus gesundem Gewebe von Madelungpatienten. Über die extrazelluläre Stimulation des β -Adrenozeptors durch Katecholamine wie Noradrenalin oder Isoprenalin wurden hingegen bei den Zellen aus erkranktem Gewebe deutlich niedrigere Lipolyseraten festgestellt. Auch ließ sich nach β -adrenerger Stimulation über Noradrenalin bei den Zellen aus betroffenem Gewebe kein Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration feststellen, es wurde also kaum ATP in cAMP umgewandelt, welches dann wiederum wie beim direkten intrazellulären Weg die Signaltransduktionskaskade für den Lipolysevorgang auslöst. Im Gegensatz dazu fiel die Konzentration an ATP bei den Zellen aus gesundem Gewebe deutlich ab, bei diesen scheint also die Lipolyse durch adrenerge Stimulation völlig regelrecht auslösbar zu sein. Hier ließ sich auch kein Unterschied zwischen Zellen aus gesundem Gewebe von MSL-Patienten und Adipozyten von gesunden Kontrollpersonen finden (Enzi, G. et al., 1977).

Ebenso ist bereits bekannt, dass eine adrenerge Denervation von Fettgewebe aufgrund der intrazellulären Ansammlung von Triglyceriden zur Hypertrophie der Zellen führt (Hauxberger, F.X., 1964). Deshalb könnten die beschriebenen Beobachtungen ein Hinweis für eine funktionelle Denervation des betroffenen Fettgewebes bei Madelungpatienten sein, da hier durch β -adrenerge Stimulation anscheinend deutlich weniger Lipolyse induziert werden kann, wohingegen bei direkter Stimulation über cAMP ähnliche Lipolyseraten wie im gesunden Gewebe erzielt werden können. Offenbar scheinen die erkrankten Zellen bei Stimulation durch Katecholamine also nicht in der Lage zu sein, ATP in cAMP umzuwandeln. Als möglicher Grund hierfür käme unter anderem ein Defekt des β -Adrenorezeptors in Frage, wodurch die Signaltransduktionskaskade der Lipolyse unterbrochen wäre. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Störungen in den Mechanismen, welche die Übertragung der hormonellen Stimulation regulieren, vorliegen. Beide Möglichkeiten könnten eine Erklärung für die Beobachtungen in dieser Studie sein, dass Zellen aus Gewebe von Patienten mit Morbus Madelung nicht auf adrenerge Stimulation anzusprechen scheinen. Des Weiteren könnte die Tatsache, dass die betroffenen Adipozyten auf den Hauptstimulus der Lipolyse nicht zu reagieren scheinen, eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Fettgewebswucherungen bei MSL-Patienten auch durch diätische Maßnahmen und

Gewichtsreduktion in ihrem Umfang und der Ausbreitung kaum zu reduzieren sind (Enzi, G. et al., 1977).

2.5 Mögliche Herkunft aus braunem Fettgewebe

Obwohl es bereits einige Vorarbeiten zur Multiplen Symmetrischen Lipomatose gibt, die teilweise bereits vor Jahrzehnten begonnen wurden, ist die Herkunft der pathologisch veränderten Adipozyten im betroffenen Gewebe von Madelungpatienten bislang noch nicht definitiv geklärt. Allerdings haben bereits mehrere voneinander unabhängige Studien ergeben, dass die Zellen aus erkranktem Gewebe kleiner sind als normale Adipozyten und mehr Ähnlichkeiten zu braunem Fettgewebe aufweisen als zu weißem. Hierfür spricht unter anderem die Lokalisation der Fettgewebsvermehrungen bei MSL-Patienten, da in diesen Körperregionen üblicherweise auch braunes Fettgewebe zu finden ist. Des Weiteren synthetisieren ASCs aus betroffenem Gewebe das mitochondriale Membranprotein UCP-1, welches einen selektiven Marker für braunes Fettgewebe darstellt (Nisoli et al., 2002; Chen et al., 2010; Nielsen et al., 2001; Enzi et al., 2015).

Braunes Fettgewebe hat im Gegensatz zu Weißem nicht die Speicherfunktion von Lipiden zur Hauptaufgabe, sondern dient der Thermoregulation und kommt überwiegend bei Neugeborenen und Säuglingen zur zitterfreien Wärmeproduktion vor (Foster, Frydman, 1979; Needergard et al., 2001). Bei mehreren Säugetierspezies verschwinden die meisten dieser Fettgewebsdepots nach der Neugeborenenperiode. Obwohl diese Beobachtung auch weit verbreitet für den Menschen angenommen wird, ist es gelungen postmortal braunes Fettgewebe bei Erwachsenen histologisch nachzuweisen (Kortelainen et al., 1993). Dies konnte auch durch eine Reihe unabhängiger Arbeiten bestätigt werden, deren Ergebnisse alle darauf schließen lassen, dass zumindest die meisten Erwachsenen noch braunes Fettgewebe besitzen, wenn auch nicht in der selben Menge wie in der Neugeborenenperiode (Cohade et al., 2003; Cypess et al., 2009; Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Diese Fettzellen zeichnen sich durch besonders reiche Vaskularisierung und eine eigene sympathische Innervation der einzelnen Zellen aus, wodurch unmittelbar durch Reize aus dem Temperaturzentrum Lipolyse ausgelöst werden kann. Im Gegensatz dazu kann diese bei Zellen aus weißem Fettgewebe nur langsamer durch hormonelle Stimulation induziert werden. Anders als die weißen univakuolären Fettzellen besitzen braune Adipozyten viele

kleine Fettvakuolen und zahlreiche Mitochondrien, durch deren hohen Gehalt an eisenhaltigen Cytochromen sich auch die bräunliche Färbung des Gewebes erklären lässt. In den Mitochondrien werden die aus der Atmungskette ausgeschleusten Protonen durch das in der Innenmembran lokalisierte Entkopplungsprotein UCP-1 an der ATP-Synthase vorbeigeleitet und fließen in die Mitochondrienmatrix zurück, wodurch die oxidative Energie nicht in ATP sondern in Wärme umgewandelt wird (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999). Interessanterweise hat eine Studie in diesem Zusammenhang gezeigt, dass Adipozyten aus erkranktem Gewebe UCP-1 synthetisieren können (Nisoli et al., 2002), welches durch Noradrenalinstimulation der β 3-Adrenozeptoren in braunem Fettgewebe aktiviert wird und so zur Wärmeerzeugung beitragen kann (Ricquier et al., 1986; Rial et al., 1984; Nicholls et al., 1984).

Eine weitere aktuelle Arbeit konnte die oben beschriebenen Beobachtungen bezüglich der Gemeinsamkeiten von betroffenem Gewebe von MSL-Patienten und braunem Fettgewebe bestätigen und weiter ausbauen. In dieser Studie wurde Gewebe von insgesamt fünf Madelungpatienten untersucht, wobei sich histologische Unterschiede zwischen erkranktem Gewebe und normalem subkutanem Fett finden ließen. So waren die Adipozyten aus betroffenen Arealen der Patienten kleiner und deutlich stärker vaskularisiert als diejenigen aus unbetroffenen Bereichen (Prantl et al., 2015). Des Weiteren wurde hier auch mRNA von Zellen aus erkranktem und gesundem Gewebe untersucht, wobei sich eine signifikant erhöhte Genexpression von UCP-1 bis 3 ergeben hat, was sich wiederum gut mit den Beobachtungen von Nisoli et al. vereinen lässt (Prantl et al., 2015). In einer weiteren aktuellen Arbeit konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von UCP-1 festgestellt werden. Aufgrund dieser Beobachtung und des typischen Verteilungsmusters von lipomatösen Gewebe bei MSL-Patienten wurde in dieser Studie die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen aus betroffenem Gewebe von braunem Fettgewebe abstammen könnten (Enzi et al., 2015). Daher hat die Gruppe um Prantl et al. Zellen aus erkranktem Gewebe auf spezielle Markergene für beiges und braunes Fettgewebe untersucht, wobei sich ergeben hat, dass bei Adipozyten aus betroffenem Gewebe die Expression von TMEM26, einem Markergen für beiges Fettgewebe, deutlich erhöht ist. Auch die Expression von PRDM16, welches als Marker für braunes Fettgewebe dient, war bei den Zellen aus erkranktem Gewebe leicht erhöht, was die Hypothese, dass die pathologisch veränderten Adipozyten von MSL-Patienten möglicherweise von braunen Fettzellen abstammen, unterstützen könnte.

2.6 Der m-TOR-Signalweg

mTOR, das mammalian target of Rapamycin, ist eine Serin-Threonin-Kinase, die an der Phosphorylierung von über 800 Proteinen beteiligt ist. Das Enzym besteht aus zwei strukturell und funktionell unterschiedlichen Komplexen, mTORC1 und mTORC2 (Guertin, Sabatini, 2007).

Beim mTORC1-Komplex handelt es sich um den Rapamycin-sensitiven Teil des Enzyms. Dieser Komplex ist an der Proliferation und am Zellwachstum beteiligt, indem er anabolische Prozesse, wie die Synthese von Proteinen, Lipiden und Zellorganellen fördert und katabolische Prozesse wie die Autophagie hemmt. So fördert mTORC1 im aktivierten Zustand durch Phosphorylierung wichtiger Regulatoren des Translationsmechanismus beispielsweise die Proteinsynthese. Hierzu gehört unter anderem auch die Phosphorylierung von EIF4EBP1, einem Bindeprotein, welches im dephosphorylierten Zustand an eIF4E, dem eucaryotic translation initiation factor, bindet und diesen so inhibiert. Da dieser Faktor entscheidend an der Initialisierung des Translationsmechanismus beteiligt ist, wird auch dieser durch das Bindeprotein blockiert. Wird EIF4EBP1 jedoch durch mTORC1 phosphoryliert, so entfällt dessen inhibitorischer Einfluss auf eIF4E und so letztlich auch auf die Translation (Guertin, Sabatini, 2007).

Außerdem aktiviert mTORC1 über Phosphorylierung RPS6K1 und RPS6K2, welche wiederum über ihre Zielproteine, das ribosomale Protein S6, EIF4EBP1 und PDCD4, einem Inhibitor der Translation, die Proteinsynthese und das Zellwachstum fördern. Außerdem fördert die Aktivierung von RPS6K1 auch die Synthese ribosomaler Proteine, wodurch wiederum vermehrt Translationsmechanismen initiiert werden können (Park et al., 2002).

Des Weiteren hemmt mTORC1 den Prozess der Autophagie, welcher unter anderem bei Nährstoffmangel von Bedeutung ist. Hierbei werden zelleigene Bestandteile von Autophagolysosomen aufgenommen und abgebaut, wodurch in Zeiten des Nahrungsmangels biologisches Material für Energiegewinnung und anabole Prozesse, wie beispielsweise Proteinsynthese, zur Verfügung gestellt werden kann. Über die Phosphorylierung von ULK1, die unc-51-like kinase 1, und ATG13, dem autophagy-related gene 13 hemmt mTORC1 diesen Prozess. Wird der Komplex hingegen durch Rapamycin inhibiert, so wird die Autophagie in den Zellen wieder gefördert (Laplante, Sabatini, 2009; Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009).

Auch bei der Lipidsynthese scheint mTORC1 eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt

werden, dass der Komplex die Aktivität von SREBP1, sterol regulatory element binding protein (Porstmann, et al, 2008), und PPAR γ , peroxosome proliferator-activated-receptor γ , fördert (Kim, Chen, 2004). Diese wiederum regulieren die Expression von Genen, welche für bei der Lipid- und Cholesterolsynthese wichtige Proteine kodieren.

Über mTORC2 ist im Gegensatz zu mTORC1 noch wenig bekannt, allerdings kann dieser Komplex nicht durch Rapamycin inhibiert werden kann. Untersuchungen zu mTORC2 wurden zudem durch die Tatsache erschwert, dass eine Deletion von Komponenten des Proteinkomplexes im Mäusemodell früh zum Tod führt. Bekannt ist jedoch, dass der Komplex über die Phosphorylierung von AKT, auch Proteinkinase B genannt, Einfluss auf das Überleben von Zellen, deren Stoffwechsel und ihre Proliferation nehmen kann (Manning, Cantley, 2007). Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass mTORC2 auch an der Ausbildung und Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist, wobei die genauen Mechanismen noch nicht ausreichend geklärt sind. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei Fehlen einiger Komponenten von mTORC2 die Polymerisierung von Aktin und die Zellstruktur gestört sind (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004).

Es bleiben also noch einige Fragen offen, was den mTOR-Signalweg angeht. In dieser Arbeit soll daher auf seine Rolle beim Krankheitsbild des Morbus Madelung eingegangen werden.

2.7 Das Immunsuppressivum Rapamycin

Rapamycin ist ein Immunsuppressivum, welches 1965 auf der Osterinsel entdeckt wurde, nach deren ursprünglichem Namen „Rapa Nui“ es benannt wurde. Hier wurde der Stoff erstmals als bakterielles Stoffwechselprodukt von *Streptomyces hygroscopicus* aus Bodenproben isoliert. Da diese Bakterien Rapamycin in ihre Umgebung abgeben, um das Wachstum von mit ihnen in Konkurrenz stehenden Pilzen zu hemmen, erhoffte man sich anfänglich eine antimykotische Wirkung von dem neuen Stoff, allerdings wurden schnell seine immunsuppressiven Nebenwirkungen entdeckt, welche heute das Haupteinsatzgebiet des Wirkstoffes darstellen (Sehgal, 2003).

So wird Rapamycin unter dem Handelsnamen Rapamune in Kombination mit Ciclosporinen und Corticosteroiden nach Nierentransplantationen zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen eingesetzt. Gegenüber Ciclosporinen hat es hier den entscheidenden Vorteil, dass es nicht

nephrotoxisch ist (Morales et al., 2002).

Auch in der Kardiologie findet der Wirkstoff unter der Bezeichnung Sirolimus Verwendung. Wenn eine Indikation für eine Koronarprothese gegeben ist, werden hier Stents mit Sirolimus beschichtet. Durch dessen antiproliferative Effekte weisen solche Stents geringere Raten an frühen Restenosen auf als unbeschichtete Stents (Abizaid, 2007).

Auch in anderen Bereichen der Forschung spielte Rapamycin bereits eine Rolle, u.a. als Substanz mit lebensverlängernder Wirkung. Forscher des US-National Institute of Ageing in Bethesda waren in diesem Zusammenhang auf Rapamycin gestoßen, da sein Wirkungsansatz der mTOR-Signalweg ist und dessen Hemmung durch Rapamycin einen ähnlichen Effekt wie eine Kalorienrestriktion hat, welche wiederum im Tiermodell bei der Maus die Lebenszeit verlängert. Hier ließ sich der ähnliche Wirkungsansatz von Rapamycin bestätigen, da sich die Gesamtlebenszeit der männlichen Tiere im Durchschnitt um 28% verlängerte, die der weiblichen sogar um 38% (Harrison et al., 2009). Auch bei der Fliegenart *Drosophila melanogaster* konnte dieser lebensverlängernde Effekt beobachtet werden (Bjedov et al., 2010). Eine Rolle hierfür könnte der Prozess der Autophagie spielen, welcher sowohl durch Nahrungsrestriktion als auch durch Inhibition des mTOR-Signalweges durch Rapamycin ausgelöst wird (Bjedov et al., 2010). Hierbei stellen die Zellen die energetisch aufwendige Proteinsynthese ein und beginnen zelleigene Bestandteile abzubauen und zu erneuern, was unter anderem für die positiven Effekte des Rapamycin verantwortlich gemacht wird.

Allerdings lagen die Dosierungen im Tiermodell deutlich höher als beim Menschen z.B. nach Nierentransplantationen. Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Substanz als starkes Immunsuppressivum nicht nebenwirkungsfrei ist, weshalb von einem breiteren Einsatz nach aktuellem Stand der Forschung noch abgesehen werden muss.

3. Zielsetzung

Der Focus dieser Arbeit liegt auf der Rolle des mTOR-Signalweges beim Krankheitsbild des Morbus Madelung, für welches es bislang keine pharmakologische Therapie gibt. In Vorarbeiten konnte mit Hilfe von Microarrays gezeigt werden, dass Gene des mTOR-Signalweges in betroffenem Gewebe von MSL-Patienten reguliert sind. Diese Beobachtung könnte einen möglichen Hinweis auf die Ursache der Erkrankung geben und dazu beitragen die Pathophysiologie hinter dem Krankheitsbild besser zu verstehen, welche bis heute noch nicht sicher aufgeklärt werden konnte.

Diese Arbeit knüpft an die beschriebenen Beobachtungen aus den Microarrays an und soll Unterschiede in der Genexpression des erkrankten Gewebes im Vergleich zu gesundem Gewebe aufzeigen. Aus diesem Grund wurde jedem Patienten dieser Studie zusätzlich zu dem erkrankten Fettgewebe auch Gewebe aus einer unbetroffenen Körperregion entnommen. Darüber hinaus sollten auch mögliche Effekte einer Inhibition des mTOR-Signalweges durch das Immunsuppressivum Rapamycin bei beiden Gewebearten untersucht werden. Ein Hauptaugenmerk hierbei liegt auf Veränderungen hinsichtlich der Genexpression bei Inhibition des mTOR-Signalweges. Dieser Punkt könnte auch in Zukunft für die Patienten von besonderem Interesse sein, da es bislang keinen kausalen Therapieansatz gibt und die chirurgische Resektion von Fettgewebe aus betroffenen Körperarealen sehr häufig mit Rezidiven einhergeht. Daher wäre es für die Patienten wünschenswert einen medikamentösen Therapieansatz zu finden, beispielsweise durch Inhibition des mTOR-Signalweges.

Eine bislang nicht hinreichend geklärte Frage zum Krankheitsbild des Morbus Madelung ist auch, ob die Ursache hierfür eher proliferativer Natur ist, also auf eine übermäßige oder unkontrollierte Vermehrung von Adipozyten zurückzuführen ist, oder ob die Gründe für die Umfangsvermehrungen des Fettgewebes in einem gestörten Ablauf bei dessen Abbau zu suchen sind, beispielsweise auf Ebene der Lipolyse. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, werden in der vorliegenden Arbeit auch diese beiden Aspekte näher untersucht. Hierzu können anhand der durchgeführten Vitalitätstests und Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie einerseits Aussagen über Abweichungen bezüglich des Proliferationsverhaltens von Zellen aus erkranktem Gewebe getroffen werden. Auf Fragen nach dem Differenzierungsverhalten und nach den katabolen Stoffwechselvorgängen der Adipozyten kann anhand der Ergebnisse der nach mehrwöchiger Differenzierung durchgeführten Oil Red Färbungen und Lipolyseassays eingegangen werden.

Eine Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Arbeit soll daher einerseits Aufschluss über die Rolle der veränderten Expression bestimmter Gene des mTOR-Signalweges in der Pathophysiologie von Morbus Madelung geben und auch die Auswirkungen einer Inhibition dieser Signaltransduktionskaskade untersuchen. Andererseits soll auch auf die Frage eingegangen werden, ob die Ursachen der Umfangsvermehrungen des Fettgewebes bei MSL-Patienten eher auf anaboler oder auf kataboler Ebene liegen, also ob diese hauptsächlich auf gesteigerte Proliferation des erkrankten Gewebes zurückzuführen sind oder ob Störungen bei dessen Abbau vorliegen.

4. Material und Methoden

4.1 Isolation von humanen adipogenen Stammzellen aus Fettgewebe

Im Zuge dieser Arbeit wurde ausschließlich mit adipogenen Stammzellen gearbeitet, welche direkt aus humanem Fettgewebe isoliert wurden. Dazu wurden bei operativen Eingriffen Gewebeproben aus erkranktem und gesundem Gewebe eines Patienten entnommen und hieraus noch am selben Tag Stammzellen isoliert. Für dieses Vorgehen wurde im Voraus ein Ethikvotum eingeholt. Außerdem wurden die ausgewählten Patienten vor den Eingriffen ausführlich über die Verwendung ihres Fettgewebes zu Forschungszwecken aufgeklärt und haben hierzu schriftlich ihr Einverständnis erklärt.

Bei den entnommenen Proben handelte es sich entweder um Lipoaspirat oder solides Fettgewebe, welches zunächst unter der Sterilbank sorgfältig mit steriler Pinzette und Schere zerkleinert wurde bis eine möglichst flüssige, homogene Suspension hergestellt werden konnte. Anschließend wurde jeweils ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 15 ml zerkleinertem Fettgewebe befüllt und eine äquivalente Menge an Medium zugefügt, welches aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's medium von Sigma-Aldrich) mit geringem Glucosegehalt, Pyruvat und 1% Penicillin und Streptomycin besteht, jedoch kein fetales Kälberserum enthält. Dieses würde mit der anschließend hinzugefügten Kollagenase reagieren, welche die Zell-Matrix-Kontakte löst und somit die Adipozyten aus dem Gewebe herauslöst. Hierzu wurden 100 mg einer Kollagenase, von Sigma-Aldrich, in 4ml sterilem PBS (Phosphate Buffered Saline von Sigma Aldrich), einer phosphatgepufferten Salzlösung, gelöst und je 300 µl dieser Lösung zu 15 ml Fettgewebe hinzugegeben. Die Endkonzentration der Kollagenase betrug hierbei 2 U/ml Fettgewebe. Nachdem die Fettsuspension mit dem zugefügten Medium und der Kollagenase durch leichtes Schütteln gut gemischt worden war, wurde sie für 45 Minuten bei 100 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) in den Schüttelinkubator gestellt, welcher zuvor auf 37°C aufgeheizt worden war. In dieser Zeit fand die Verdauungsreaktion mittels Kollagenase statt.

Nach 45 Minuten wurde die Suspension unter der Sterilbank mindestens zehn Mal mit einer 10 ml Pipette auf- und abpipettiert um eine homogene, gut filtrierbare Lösung zu erhalten. Diese wurde durch einen 100 µm SteriflipFilter von Millipore gesaugt, durch dessen Poren größere Partikel zurückgehalten werden.

Die Suspension mit den filtrierten adipogenen Stammzellen wurde daraufhin für fünf Minuten bei 500 rcf (relative centrifugal force, „relative Zentrifugalkraft“) zentrifugiert. Anschließend

wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen, während das Pellet, welches die Stammzellen enthält, mit 10 ml PBS gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 500 rcf zentrifugiert wurde. Nachdem auch das überschüssige PBS abgenommen worden war, wurde das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert. Hierzu wurde α -MEM (α -Minimum Essential Medium Eagle von Sigma Aldrich) mit 16,7% FBS (Fetal Bovine Serum von Sigma Aldrich), 1% Penicillin und Streptomycin und 1% GlutaMax verwendet, welches im Folgenden als Zellkulturmedium bezeichnet wird. Die resuspendierten Zellen wurden schließlich mit 25 ml desselben Mediums, welches zuvor auf 37°C aufgewärmt worden war, in eine T175-Flasche ausgesät und in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Im folgenden Verlauf wurde alle drei Tage das Medium gewechselt und die Proliferation der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert, um den Zeitpunkt der Konfluenz zu ermitteln.

4.2 Zellkultur und Passagieren

Da sämtliche Versuche dieser Arbeit in Passage fünf durchgeführt wurden, mussten die aus humanem Fettgewebe isolierten Stammzellen zunächst kultiviert und insgesamt fünf Mal passagiert werden.

Entweder wurden frisch isolierte oder eingefrorene Zellen verwendet. Hierzu wurden die bei minus 196°C im Stickstofftank eingefrorenen Zellen zunächst zügig aufgetaut und sofort in einer T175-Flasche mit 30ml Zellkulturmedium versetzt. Grundsätzlich wurden immer ca. 1000000 Zellen in 0,5ml Kryomedium eingefroren, welches sich aus Zellkulturmedium und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) zusammensetzt. Um die zytotoxischen Effekte des DMSO möglichst gering zu halten wurde stets auf ein sehr rasches Einfrieren und Auftauen der Zellen geachtet, sowie auf eine sofortige starke Verdünnung der DMSO-Konzentration durch Zellkulturmedium nach dem Auftauen.

Anschließend wurden die Zellen in den Brutschrank bei 37°C gestellt um ihnen optimale Proliferationsbedingungen zu bieten. 24 Stunden später wurde standardmäßig ein erster Medienwechsel mit Zellkulturmedium durchgeführt, um letzte Reste des DMSO vollständig von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Zeitpunkt der Subkonfluenz abgewartet, wobei das Medium in diesem Zeitraum alle zwei Tage gewechselt wurde, hierbei wurde auch regelmäßig das Stadium der Konfluenz mit dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung überprüft.

Sobald dieses erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zu jeder Flasche 2,5ml einer 0,25%igen Trypsinlösung gegeben, wobei dieses vorher einige Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert wurde, da das Enzym, welches eine im menschlichen Verdauungssystem vorkommende Protease aus dem Pankreas ist, seine optimale Wirkung bei Körpertemperatur besitzt. Aus diesem Grund wurden die Zellen daraufhin sofort für vier bis maximal acht Minuten im Brutschrank bei ebenfalls 37°C inkubiert. Nach vier Minuten erfolgte eine erste Kontrolle unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung, ob sich der Zellrasen bereits abgelöst hatte. Falls der Großteil der Zellen noch adhärent war, wurde die Flasche für weitere zwei Minuten in den Brutschrank gestellt und erneut kontrolliert. Sobald die Ablösung der ursprünglich langgestreckten adhärenen Zellkörper zu kleinen, kugelförmigen, frei schwimmenden Zellen festgestellt werden konnte, wurde die durch das Trypsin ausgelöste Verdauungsreaktion sofort mit 5ml Zellkulturedium abgestoppt, um zu verhindern, dass das Trypsin die Zellen schädigt. Durch den 16,7%igen proteinreichen FCS-Anteil des Mediums kann die Protease hierdurch abgefangen werden.

Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden die Zellsuspensionen aus den T175-Flaschen in 15ml- Zentrifugenröhrchen überführt und um möglichst auch noch adhärenente Zellen zu erfassen, wurden die Flaschen mit der Zellsuspension gespült.

Zum Auszählen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Je eine der beiden Zählkammern wurde mit 20µl der entsprechenden Zellsuspension befüllt, welche durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesaugt wird. Im Anschluss daran wurden vier große Quadrate der Zählkammer unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt und die entsprechenden Zellzahlen notiert. Hieraus lassen sich die Zellzahl pro Milliliter und die Gesamtzellzahl wie folgt berechnen:

$$\Sigma \text{ Zellzahl aller Quadrate} / 4 = \text{Mittelwert der Zellzahl/Quadrat}$$

$$\text{Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates} \times 10000 = \text{Zellen/ml}$$

$$\text{Zellen/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Aus der Zellzahl pro ml wurde dasjenige Volumen berechnet, in dem sich eine Million Zellen befinden, da ein Teil der Zellen jeweils in dieser Menge weggefroren wurde während der andere Teil, ebenfalls je ca. eine Million Zellen erneut ausgesät wurde um die Zellen für die Versuche bis Passage fünf weiterzukultivieren. Das jeweils errechnete Volumen wurde in Zentrifugenröhrchen aliquotiert und anschließend bei 300 ref für fünf Minuten zentrifugiert.

Der sich hierbei gebildete Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgesaugt um das Zellpellet vollständig zu erhalten und die letzten Reste des Trypsin von den Zellen zu entfernen.

Für diejenigen Zellen, die wieder ausgesät werden sollten, wurden in je eine T175-Flasche 30 ml Medium vorgelegt und anschließend das Zellpellet mit einem Milliliter Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Schließlich wurden die so gelösten Zellen in die vorbereitete T175-Flasche pipettiert, dort durch leichtes Schwenken verteilt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.3 Kryokonservierung von Stammzellen

Ein Teil der Zellen wurde nach dem Passagieren für spätere Versuche eingefroren. Hierzu wurden jeweils eine Million Zellen in 0,5 ml Kryomedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen pipettiert und in einem speziellen Einfrierbehälter (NALGENE Cryo 1°C Freezing Container), welcher ein schonendes Herunterkühlen um 1°C pro Minute ermöglicht, sofort bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in den Stickstofftank bei -196°C überführt.

4.4 Adipogene Differenzierung

Um die Zellen auch in ihrem ausgereiften Zustand untersuchen zu können und Fragestellungen hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit beantworten zu können, mussten sie adipogen differenziert werden. Hierzu wurden die Zellen mit adipogenem Differenzierungsmedium behandelt, dessen Grundlage Zellkulturmedium in der folgenden Zusammensetzung war:

–500 ml α -MEM (von Sigma-Aldrich)

–100 ml FBS (fetales Kälberserum), entspricht einer Endkonzentration von 16,7 %

–6 ml Penicillin/Streptomycin, entspricht einer Endkonzentration von 1%

–6 ml Glutamax, entspricht einer Endkonzentration von 1%

Diesem Medium wurden pro 1 ml noch folgende Zusätze zugefügt, die die adipogene Differenzierung stimulieren:

–11 μ l IBMX (45mM), entspricht einer Endkonzentration von 500 μ M

- 1 µl Dexamethason (1 mM), entspricht einer Endkonzentration von 1 µM
- 5,733 µl Insulin (10 mg/ml), entspricht einer Endkonzentration von 10 µM
- 5,75 µl Indomethacin (35 mM), entspricht einer Endkonzentration von 200 µM

4.5 Vitalitätstests mit Resazurin

Für die Vitalitätstests mit Resazurin wurden zunächst Zellen von gesundem und erkranktem Gewebe eines Patienten in 96-well-Platten mit einer Dichte von 2800 Zellen/cm² ausgesät. Es wurde bewusst eine etwas geringere Dichte gewählt, um die Zellen nicht in ihrer Proliferation zu hemmen. Insgesamt wurden auf diese Weise je 15 wells mit Zellen von gesundem und erkranktem Gewebe befüllt. 24 Stunden später wurden davon jeweils 5 wells mit Zellkulturmedium ohne Rapamycin behandelt, 5 wells mit einer Rapamycinkonzentration von 1ng/ml und 5 mit 10ng/ml. Die Messung mit Resazurin erfolgte jeweils 48 Stunden und 96 Stunden nach Rapamycinzugabe, daher wurden pro Patient zwei Platten benötigt, wobei bei der zweiten Platte für Tag vier nach zwei Tagen ein Medienwechsel mit den entsprechenden Rapamycinkonzentrationen erfolgte.

48 Stunden nach der Zugabe von Rapamycin wurde das Medium der ersten Platte abgesaugt und in jedes well eine Mischung aus 90µl Zellkulturmedium und 10µl Resazurin gegeben. Resazurin ist ein blauer, nicht-fluoreszierender Farbstoff, der in den Mitochondrien von vitalen Zellen unter Oxidation von NADH zu NAD⁺ zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Nach der Zugabe des Farbstoffes wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C für zwei Stunden inkubiert und anschließend die Fluoreszenz mit dem Plattenphotometer Varioskan Flash von Thermo Scientific bei 570 nm Emission gemessen. Nach einer weiteren Stunde erfolgte eine erneute Messung unter den gleichen Bedingungen, ebenso wurde mit der zweiten Platte nach 96 Stunden verfahren. Anhand der Stärke der Fluoreszenz des umgesetzten Farbstoffes konnte so auf die Vitalität der Zellen geschlossen werden.

4.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence-activated cell sorting) genannt, wurde zur Analyse der Zellzyklusaktivität durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen aus gesundem und erkranktem Gewebe eines Patienten in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in T75-Flaschen ausgesät und in den Brutschrank bei 37°C überführt. 24 Stunden später erfolgte die Zugabe von Rapamycin, wozu das alte Medium zunächst abgesaugt wurde und die Zellen anschließend mit Zellkulturmedium je mit den Rapamycinkonzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml behandelt wurden.

Erneut 24 Stunden später erfolgte dann die Vorbereitung für die Durchflusszytometrie. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend jeder T75-Flasche 2,5 ml Trypsin hinzugefügt, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Im weiteren Verlauf wurde zunächst wie beim Passagieren verfahren (siehe Kapitel 3.2, S. 5-6)

Da in dieser Arbeit stets 500000 Zellen von jeder Probe eingesetzt werden sollten, wurde hieraus wie folgt noch das Volumen ermittelt, in dem sich genau diese Anzahl an Zellen befand:

$$500000 / (\text{Zellzahl/ml}) = \text{Volumen, in dem sich 500000 Zellen befinden}$$

Dieses Volumen wurde nun in ein spezielles FACS-Tube überführt, in dessen Verschluss ein feines Zellsieb integriert ist. Hierin wurde die Zellsuspension zunächst für fünf Minuten bei 300 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 2 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde erneut fünf Minuten bei 300 rcf zentrifugiert und der Überstand ebenfalls verworfen. Dem Zellpellet sollten nun zur Fixierung der Zellen je 500 µl eiskaltes, 70%iges Methanol hinzugegeben werden. Um jedoch eine bessere Durchmischung der Zellen zu erreichen und möglichst alle Zellen zu erfassen, wurden jedem Tube zunächst 150 µl eiskaltes PBS hinzugefügt und anschließend auf dem Vortexer noch 350 µl eiskaltes, 100%iges Methanol ergänzt, wodurch wieder eine 70%ige Methanollösung entstand. Zur Fixierung der Zellen wurden die Tubes nun mit Parafilm verschlossen und bei 4°C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Hierbei wurde stets darauf geachtet, dass eine Lagerungsdauer von mindestens zwölf Stunden nicht unterschritten wurde.

Am folgenden Tag wurde den Proben jeweils 1 ml FACS-Waschpuffer hinzugegeben, welcher aus PBS mit 0,01% NaN₃ (Natriumazid von Roth), 0,5% BSA (bovines Serum Albumin) und 2 mM EDTA besteht. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nachdem dieser Vorgang ein weiteres Mal wiederholt worden war, wurden jedem Zellpellet mit 500000 Zellen 440 µl FACS-Waschpuffer und 50 µl RNase zugefügt, die Tubes mit Parafilm verschlossen und für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden jeder Probe zur Anfärbung der Zellen 10 µl DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) hinzugegeben, einem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff, welcher bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet. Zur besseren Durchmischung wurden die Tubes kurz gevortext und anschließend mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Kurz vor der Messung am Durchflusszytometer wurde die Zellsuspension noch mit einer Pipettenspitze aufgenommen und durch das feine Zellsieb in der Verschlusskappe der FACS-Tubes, den cell-strainer, gepresst. Dieser Filter ist so fein, dass nur einzelne Zellen hindurchgelangen, während Dubletten weitestgehend aussortiert werden. Hierdurch wird eine Verfälschung des Ergebnisses verhindert, da Dubletten vom Durchflusszytometer nur als eine Zelle erfasst werden, jedoch ebenso wie einzelne Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus die doppelte Menge an DNA besitzen. Somit werden Dubletten vom Durchflusszytometer als einzelne Zellen in der G2-Phase erfasst. Ein fälschlicherweise zu hoher Wert in der Anzahl dieser Zellen wird zwar durch Dublettendiskriminierung, welche über die Messung der Weitensignale ermöglicht wird, verhindert, jedoch kann der Anteil an Dubletten in der Probe durch das Verwenden eines Zellsiebs von Anfang an gering gehalten werden und somit auch die Anzahl an verwertbaren Einzelzellen für die Messung erhöht werden.

Die filtrierte Zellsuspension wurde schließlich dem Durchflusszytometer zugeführt, dem BD FACSCANTO II von BD Biosciences, wobei stets mindestens 50000 Ereignisse gezählt wurden.

4.7 Isolation von RNA aus adipogenen Stammzellen

Um die Genexpression der Zellen aus gesundem und erkranktem Gewebe untersuchen zu können, wurden PCRs durchgeführt, wozu zunächst RNA aus den entsprechenden Zellen isoliert werden musste.

Hierzu wurden die Zellen direkt nach dem Passagieren in Passage fünf in 6-well-Plates in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm² ausgesät, wobei für jeden Parameter Triplikate erstellt wurden. Hieraus wurden später bei der Durchführung der PCRs Mittelwerte gebildet.

Im weiteren Verlauf wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt und die Proliferation unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Der Tag der Konfluenz der Zellen wurde als Tag 0 gewählt. Hier wurde bereits RNA von je drei wells für Tag 0 isoliert. Die restlichen Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt über sieben Tage hinweg mit den Rapamycinkonzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml jeweils in Zellkulturmedium und in adipogenem Differenzierungsmedium behandelt. An Tag 7 wurde auch hier die RNA isoliert.

Hierzu wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend jedem well 350 µl RLT-Lysepuffer zugefügt, welcher zuvor mit 1% β -Mercaptoethanol versetzt worden war, um die Oxidation der RNA zu minimieren. Hierzu wurden noch jeweils 350 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt, was für die Bindung der RNA an die Filtermembran des Sammelröhrchens im nächsten Schritt nötig ist. Dazu wurden die 700µl in ein Sammelröhrchen pipettiert, welches einen feinen Filter enthält. Hierin wurde die Lösung nun für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert, wodurch die RNA an die Filtermembran gebunden wurde. Anschließend wurden jedem tube 700 µl RW1-Waschpuffer zugefügt und erneut 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde mit jeweils 500 µl des zweiten Waschpuffers RPE auf gleiche Art und Weise verfahren, anschließend wurden jedem tube nochmals 500 µl RPE-Puffer hinzugefügt, diesmal für zwei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die drei Schritte mit den beiden Waschpuffern dienen dem Auswaschen von verschiedenen Biomolekülen, wie Kohlenwasserstoffen, Proteinen und Fettsäuren, so dass letztendlich nur noch RNA an die Filtermembran gebunden ist. Diese wurde im Folgenden in ein neues Sammelröhrchen gesetzt und erneut bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Diese wurde schließlich in ein 1,5 ml Collection Tube (von Qiagen) gesetzt, 30 µl RNase-freies Wasser zugefügt und die Cups eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die isolierte RNA von der Membran losgelöst und in wässrige Lösung gebracht. Anschließend wurden die auf diese Art und Weise isolierten RNA-Proben zur Aufbewahrung ohne weitere zeitliche Verzögerung bei -80°C eingefroren.

4.8 Reverse Transkription

Um mit der isolierten RNA PCRs durchführen zu können, musste diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden, da die in der PCR eingesetzten Polymerasen zur Amplifikation DNA als Vorlage benötigen, es handelt sich also um DNA-abhängige DNA-Polymerasen.

Für die reverse Transkription wurde der QuantiTect Reverse Transkription Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, welcher auch das entscheidende Enzym für den Prozess, die Reverse Transkriptase, enthält. Hierbei wiederum handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Zunächst wurde mittels Spektralphotometer (Nano Drop 2000c von Thermo Scientific) die Konzentration der einzelnen RNA-Proben gemessen, um in den PCRs äquivalente Mengen an cDNA einsetzen zu können. Aus den Konzentrationen wurden dann die Volumina berechnet, in denen genau 1 µg RNA enthalten war. Diese wurden daraufhin mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und anschließend wurden 2 µl gDNA-Wipeout Puffer hinzugefügt und für zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Dieser Schritt dient dem Verdau eventuell noch vorhandener Reste von genomischer DNA.

Im Anschluss daran fand die eigentliche reverse Transkription statt. Hierzu wurden zu den 14 µl jeder Probe jeweils 4 µl Quantiscript RT-Puffer, 1 µl RT Primer Mix und 1µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und für 15 Minuten bei 42°C inkubiert. In dem RT Primer Mix sind kurze Primer mit einer Länge von nur sechs Nukleotiden enthalten, sogenannte Random-Hexamer-Primer, wodurch diese sehr unspezifisch sind und an mehreren Stellen jedes RNA-Moleküls binden können. Des Weiteren sind noch Oligo-dT-Primer enthalten, die an den Poly-A-Schwanz von mRNA binden. Nach der eigentlichen Transkription wurden die Proben noch für drei Minuten bei 95°C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und noch vorhandene RNA-DNA-Hybridmoleküle zu denaturieren. Die daraufhin erhaltene cDNA wurde zur Aufbewahrung ohne zeitliche Verzögerung bei -20°C weggefroren.

4.9 Polymerasekettenreaktion

Um die Genexpression der Zellen vergleichen zu können, wurden mit der cDNA, welche durch reverse Transkription aus der isolierten RNA erhalten worden war, PCRs durchgeführt. Hierzu wurde der DyNAmo Color Flash SYBR Green Master Mix der Firma Thermo

Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieser enthält die DNA-Polymerase, den Polymerasepuffer und die dNTPs, die Desoxyribonukleotidtriphosphate, aus welchen bei der Amplifikation die neuen DNA-Stränge gebildet werden. Außerdem wurden für die PCRs noch spezifische Primer für die zu untersuchenden Gene benötigt (siehe Tabelle 1). Die zugehörigen Sequenzen wurden mit dem online-Programm Primer Blast auf der Homepage des NCBI erstellt, dem National Center of Biotechnology Information, welches seinen Sitz in Bethesda, Maryland hat und eine Unterorganisation des United States National Library of Medicine (NLM) ist, welches wiederum dem National Institute of Health (NIH) angegliedert ist.

Zunächst wurden für jede cDNA-Probe 5 µl DyNAmo Master Mix, 3 µl nukleasefreies Wasser, 0,5 µl forward Primer (10 pmol/µl), 0,5 µl reverse Primer (10 pmol/µl) und 1 µl der cDNA-Probe, welche 50 ng cDNA enthält, in ein well eines ECO 48-well-plates pipettiert. Zum Schluss wurde auf dieselbe Art und Weise noch die No-Template-Control (NTC) pipettiert, allerdings wurde hier anstelle der cDNA-Probe nur 1 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Die NTC diente im weiteren Verlauf bei der Fluoreszenzmessung zur Kontrolle, dass sich keine Verunreinigungen in den Proben befanden, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten.

Anschließend wurde mit der eigentlichen PCR begonnen. Hierzu wurde das Eco Real-Time PCR-Gerät von Illumina mit der zugehörigen Software verwendet. Im 1. Schritt, dem initialen Denaturierungsschritt, wurden die Proben bei 95°C für zehn Minuten inkubiert, um die Polymerase, bei der es sich um eine sogenannte Hot-Start-Polymerase handelt, zu aktivieren. Diese Form der Polymerase ist an einen Antikörper gebunden und kann erst durch Lösung dieser Bindung bei hohen Temperaturen aktiviert werden. Der 2. Schritt stellt ebenfalls einen Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden dar, welcher der Trennung der im weiteren Verlauf bei der Amplifikation gebildeten neuen DNA-Stränge dient. Im 3. Schritt werden die Proben auf die optimale Annealing- temperatur herabgekühlt, welche vom jeweiligen Primer abhängt und in der Regel bei ca. 60°C liegt. Die exakte Temperatur für die Anlagerung des Primers an seinen spezifischen Abschnitt des DNA-Stranges hängt jedoch unter anderem von dessen GC-Gehalt ab, da die DNA-Basen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, Adenin und Thymin jedoch nur zwei. Im 4. Schritt findet dann die Elongation bei 72°C für 25 Sekunden statt, bei der die Polymerase ausgehend vom entsprechenden Primer den komplementären DNA-Strang bildet. Hierbei interkaliert auch der fluoreszierende Farbstoff in die neu gebildeten DNA-Doppelstränge. Schließlich dient das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes bei der am Ende dieses Schrittes

folgenden Fluoreszenzmessung als Maß für die Expression des untersuchten Gens. Der beschriebene Ablauf wurde ab dem 2. Schritt in 40 Zyklen wiederholt.

Gen	Sequenz	Annealingtemperatur
GAPDH	5'-GAAAGATGGTGATGGGATTTC	60°C
	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	
mTOR	5'-CGAAGCCGCGCGAACC	59°C
	5'-ATTCGGGCTCTTTAGGCCAC	
EIF4EBP1	5'-GGAGTGTGCGAACTCACCTG	62°C
	5'-ACTGTGACTCTTCACCGCC	
RPS6K1	5'-TGTCGACAGCCAGATGACT	60°C
	5'-ATTTGACTGGGCTGACAGGT	

Tabelle 1: Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer

4.10 Oil Red Färbung und Quantifizierung des Farbstoffes

Die Oil-Red Färbung und deren Quantifizierung mittels Auswaschung des Farbstoffes wurde durchgeführt, um gesundes und erkranktes Gewebe von MSL-Patienten hinsichtlich der Differenzierungsfähigkeit vergleichen zu können. Hierzu wurden die Zellen jeweils aus gesundem und erkranktem Gewebe eines Patienten zunächst mit einer Dichte von 10000 Zellen/cm² in 24-well-Platten ausgesät und der Zeitpunkt der Konfluenz abgewartet, wobei alle drei Tage ein Medienwechsel mit Zellkulturmedium durchgeführt wurde. Der Zeitpunkt der Konfluenz der Zellen wurde jeweils als Tag 0 gewählt und stellte den Startpunkt einer dreiwöchigen adipogenen Differenzierung dar. Hierzu wurden je vier wells mit Zellen von gesundem und erkranktem Gewebe mit Zellkulturmedium ohne Rapamycin behandelt und jeweils vier wells mit adipogenem Differenzierungsmedium ohne Rapamycin, einer Rapamycinkonzentration von 1 ng/ml und einer Rapamycinkonzentration von 10 ng/ml. Während der drei Wochen wurde das entsprechende Medium alle drei Tage gewechselt.

Nach dreiwöchiger Differenzierung wurde die Oil Red Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit gekühltem PBS gewaschen und anschließend wurden jedem well 500µl 4%iger Paraformaldehyd zugefügt und fünf Minuten zur Fixierung auf den Zellen belassen. Im Anschluss wurde dieser vorsichtig abpipettiert und die Zellen mit 60%igem Isopropanol gewaschen, wonach die wells gründlich trocknen mussten, da das Isopropanol sonst die Färbung beeinträchtigt.

Anschließend wurde die Oil Red Arbeitslösung aus der Standardlösung und destilliertem Wasser im Verhältnis 3:2 hergestellt werden. Für die Standardlösung wiederum wurden zuvor 125 mg Oil Red O-Pulver in 50 ml Isopropanol gelöst. Oil Red ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der verwendet werden kann um Triacylglyceride in Zellen rötlich anzufärben. In diesem Zusammenhang kann anhand der Färbung auf den Grad der Differenzierung von Adipozyten geschlossen werden.

Nach gründlicher Trocknung der wells wurden je 500µl der Arbeitslösung in jedes well vergeben und für 20 Minuten gefärbt, wobei die Anfärbung der Lipidtröpfchen nach 10 Minuten unter dem Lichtmikroskop bei 40- und 100-facher Vergrößerung kontrolliert wurde. Nach der 20-minütigen Färbezeit wurde der Farbstoff abpipettiert und jedes well viermal mit je 500 µl destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die angefärbten Zellen von gesundem und erkranktem Gewebe mit allen vier verschiedenen Behandlungen bei 100-facher Vergrößerung mit je 500µl destilliertem Wasser unter dem Lichtmikroskop fotografiert um anhand der Intensität der Anfärbung bereits Rückschlüsse auf den Grad der Differenzierung ziehen zu können.

Zur genaueren Quantifizierung wurde der Farbstoff anschließend noch mit 100%-igem Isopropanol ausgewaschen und die Absorption mit dem Plattenphotometer Varioskan Flash von Thermo Scientific bei 500 nm vermessen. Hierzu wurde das destillierte Wasser abpipettiert und in jedes well 250µl Isopropanol vergeben. Anschließend wurden die Zellen dann für 15 Minuten auf dem Orbitalschüttler (Polymax 2040 von Heidolph) bei Stufe 5 entfärbt und 200µl des gelösten Farbstoffes (entspricht 80%) jedes wells in ein well einer 96-well Platte überführt. Diese wurde dann photometrisch mit dem Plattenphotometer vermessen. Aus den Ergebnissen konnte so anhand der Menge des ausgewaschenen Farbstoffes auf den Lipidgehalt in den Zellen geschlossen werden und somit letztlich auf deren Differenzierungsgrad.

4. 11 Lipolyse-Assay

Lipolyse-Assays wurden durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit des β -Adrenozeptors in erkranktem und gesundem Gewebe vergleichen zu können und somit letztlich die Fähigkeit der Zellen auf Fettabbauende Stimuli des Körpers, im Speziellen Katecholamine, zu reagieren. Hierdurch sollte in dieser Arbeit nicht nur die Frage nach dem vermehrten Aufbau

von Fettgewebe bei Madelungpatienten durch gesteigerte Proliferation und Zellvitalität untersucht werden, sondern auch auf die Seite des Fettabbaus eingegangen werden.

Bei der Lipolyse werden die Triacylglyceride aus den Adipozyten hydrolytisch in freie Fettsäuren und Glycerin gespalten, welche an das Blut bzw. in diesem Test an das Zellkulturmedium abgegeben werden. Dieser Vorgang kann auf verschiedene Arten stimuliert werden, einerseits direkt über cAMP, welches die Proteinkinase A aktiviert, die wiederum ihrerseits die hormonsensitive Lipase phosphoryliert und aktiviert. Die Stimulation kann aber auch über den β -Adrenozeptor erfolgen, wodurch über die Aktivierung der Adenylatcyclase vermehrt cAMP produziert wird. In diesem Assay erfolgt die Stimulation der Lipolyse daher auf zwei verschiedene Arten, einmal mit cAMP direkt und einmal mit Isoprotenerol, einem Katecholamin, welches β -adrenerge Rezeptoren aktiviert.

Es wurde das 3T3-L1 Lipolyse Assay Kit der Firma Bio Vision nach Angaben des Herstellers verwendet. Das bei dem Test durch Induktion der Lipolyse freiwerdende Glycerin kann anschließend mit colorimetrischen Verfahren gemessen werden, wobei die Farbintensität direkt proportional zu der Menge an freigesetzten Glycerin ist.

Zunächst wurden die Zellen in einer 96-well-Platte mit einer Dichte von 10000 Zellen pro cm^2 ausgesät und der Zeitpunkt der Konfluenz abgewartet, wobei regelmäßige Kontrollen mit dem Lichtmikroskop erfolgten. In diesem Zeitraum wurde das Zellkulturmedium alle drei Tage gewechselt. Der Zeitpunkt der Konfluenz der Zellen wurde als Tag 0 einer dreiwöchigen adipogenen Differenzierung gewählt, wobei jeweils ein Teil der Zellen mit adipogenem Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 4.4) ohne Rapamycin und den Rapamycinkonzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml behandelt wurde. An Tag 21 wurde der Lipolyse Assay durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit je 100 μl des Lipolyse-Waschpuffers aus dem Kit gewaschen, anschließend wurden die Platten auf Tüchern ausgeklopft, um den Puffer vollständig zu entfernen. Daraufhin wurden jedem well 150 μl Lipolyse Assay Puffer hinzugefügt, welchem bei der Hälfte der Zellen 1,5 μl einer 10 μM Isoprotenerollösung (entspricht einer Endkonzentration von 100 nM) zugesetzt wurden, während bei der anderen Hälfte cAMP zugefügt wurde. Bei denjenigen Zellen, die über drei Wochen hinweg mit den Rapamycinkonzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml behandelt worden waren, wurde dem Assay Puffer noch in PBS gelöstes Rapamycin in den entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für drei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit fand die Lipolyse statt, entweder stimuliert durch Isoprotenerol oder cAMP. Nach Ablauf dieser Zeit wurden jedem well 50 μl einer Reaktionsmischung, bestehend aus 46 μl Glycerol Assay Puffer, 2 μl Glycerol Standard und 2

µl Glycerol Enzym Mix, hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben noch für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und hierbei mittels Alufolie vor Licht geschützt. Schließlich wurde die Absorption bei 570 nm mit dem Plattenphotometer Varioskan Flash von Thermo Scientific colorimetrisch vermessen.

5. Ergebnisse

5.1 Vitalitätstests mit Resazurin

Bei den Vitalitätstests mit Resazurin konnte im unbehandelten Zustand eine deutlich höhere Zellaktivität bei den Zellen aus erkranktem Gewebe gegenüber denjenigen aus Gesundem festgestellt werden. Durch Rapamycinzugabe ließ sich die Vitalität in beiden Fällen senken, wobei jedoch der Abfall prozentual zum jeweiligen Ausgangswert bei den Zellen aus Madelunggewebe deutlich stärker ausgeprägt war.

Patient 1 wurde zum Austesten verschiedener Konzentrationen mit 0, 0,01, 0,1, 1 und 10 ng Rapamycin/ml behandelt. Im unbehandelten Zustand war die Zellvitalität im erkrankten Gewebe um das 1,54-Fache erhöht. Durch Rapamycinzugabe fiel die Aktivität stufenweise bis auf 1,12 bei 10ng/ml ab, wobei der größte Abfall zwischen den Konzentrationen 0,01 und 0,1 ng/ml lag. Bei den Zellen aus unbeeinträchtigtem Gewebe fiel der Effekt der Rapamycinzugabe etwas geringer aus. Hier ist die Zellvitalität bei den niedrigen Konzentrationen zunächst leicht angestiegen, um dann von 1 im unbehandelten Zustand stufenweise auf 0,87 bei 10 ng/ml zu fallen.

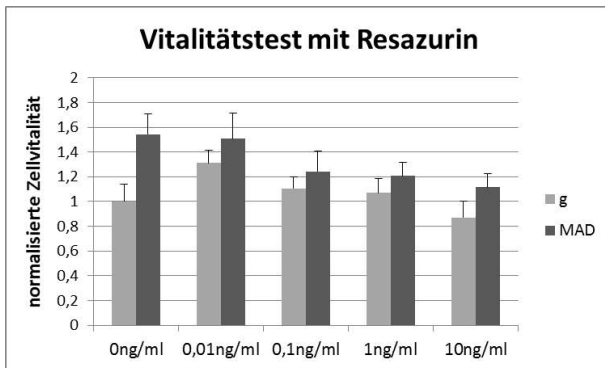
Bei Patient 2 war die Zellvitalität im erkrankten Gewebe um das 1,16-Fache erhöht und fiel unter Rapamycinbehandlung auf 0,63 bei 10 ng/ml ab. Der stärkste Abfall auf 0,65 erfolgte jedoch bereits bei der Konzentration 1 ng/ml. Bei den Zellen aus unbeeinträchtigtem Gewebe fiel der Abfall von 1 im unbehandelten Zustand auf 0,88 bei 10 ng/ml ebenso wie bei Patient 1 etwas geringer aus.

Bei Patient 3 war die Zellvitalität im erkrankten Gewebe um das 1,71-Fache erhöht und fiel unter Rapamycinzugabe bis auf 0,47 bei 10 ng/ml ab. Prozentual gesehen war auch hier der Abfall bei den Zellen aus gesundem Gewebe von 1 im unbehandelten Zustand auf 0,60 bei 10 ng/ml etwas geringer.

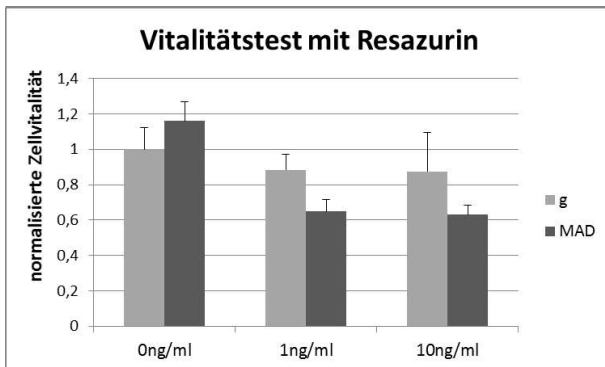
Die Vitalität der Zellen aus betroffenen Gewebe war bei Patient 4 im Vergleich zum gesunden Gewebe um das 1,37-Fache erhöht und fiel unter Behandlung mit Rapamycin bis auf 0,61 bei 10 ng/ml ab. Bei den Zellen aus unbeeinträchtigtem Gewebe fiel die Vitalität von 1 im unbehandelten Zustand bis auf 0,46 bei 10 ng/ml ab.

Bei Patient 5 war die Zellvitalität im erkrankten Gewebe mit dem 2,25-Fachen im Vergleich zum gesunden Gewebe am stärksten erhöht. Der Wert fiel unter Rapamycinzugabe auf 0,97 bei 10 ng/ml ab. Bei den Zellen aus dem gesunden Gewebe dieses Patienten erfolgte ein Abfall von 1 im unbehandelten Zustand auf 0,64 bei 10 ng/ml.

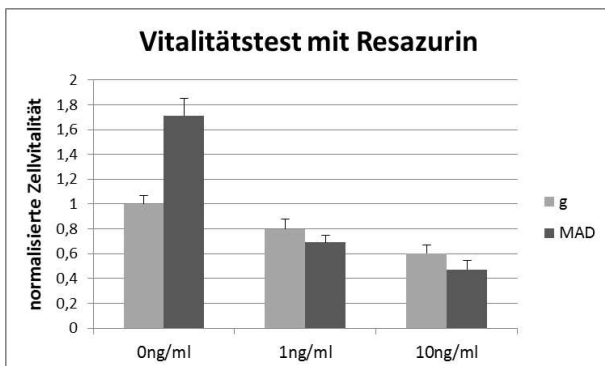
Patient 1:



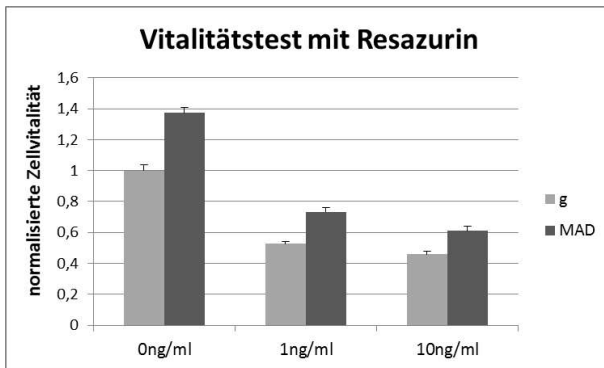
Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:



Patient 5:

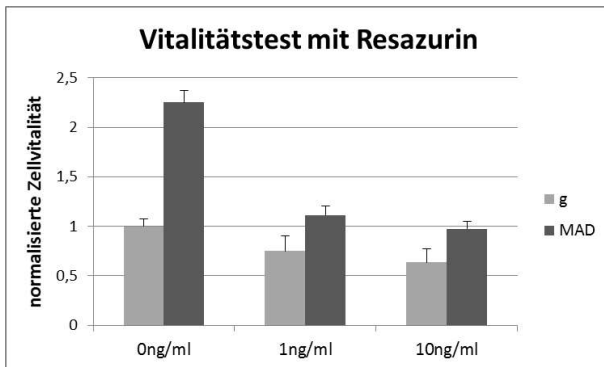


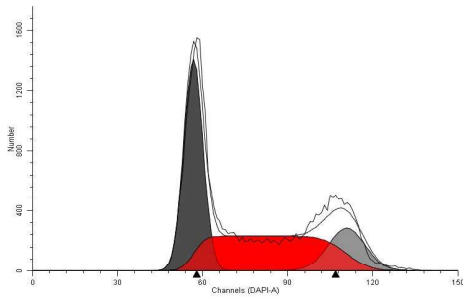
Abbildung 7: normalisierte Zellvitalität, gemessen 48 Stunden nach Rapamycinzugabe und nach 2-stündiger Inkubation mit Resazurin; x-Achse: Rapamycinkonzentrationen in ng/ml; y-Achse: normalisierte Zellvitalität; Legende: g = gesund; MAD = Madelung

5.2 FACS (Durchflusszytometrie)

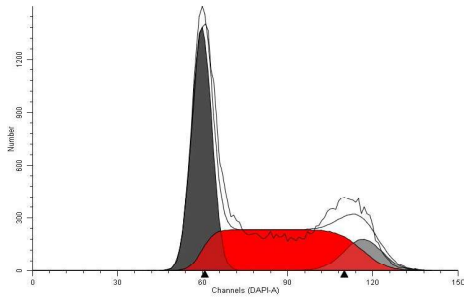
Die Messungen am Durchflusszytometer wurden durchgeführt, um die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen sowohl bei Zellen aus gesundem als auch aus erkranktem Gewebe untersuchen zu können. Hierbei ließen sich kaum Unterschiede zwischen dem von MSL betroffenen Gewebe und gesundem Gewebe zeigen. Bei beiden Gewebearten war im unbehandelten Zustand der Anteil der Zellen in der G1-Phase am höchsten, gefolgt von der S-Phase und schließlich der G2-Phase. Bei Zugabe von Rapamycin verhielten sich beide Arten von Zellen ebenfalls ähnlich, hier nahmen die Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen noch weiter zu. Der Anteil der Zellen in G1-Phase stieg noch weiter an, während derer der Zellen in S- und G2-Phase stufenweise abfiel.

Im Folgenden sind exemplarisch die FACS-Ergebnisse eines Patienten dargestellt (Abbildung 8):

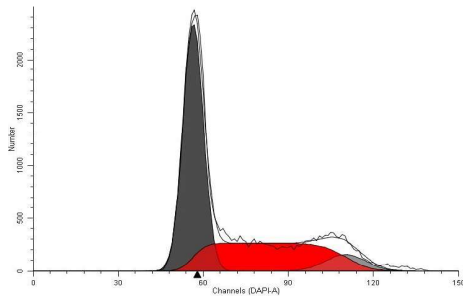
g 0 R:



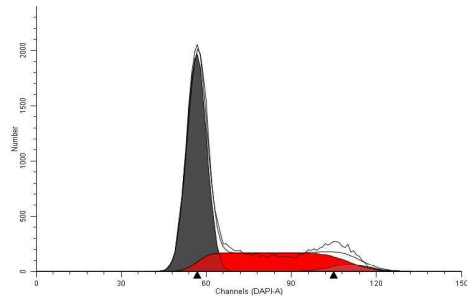
MAD 0 R:



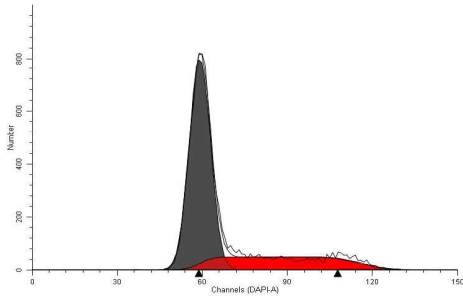
g 1 R:



MAD 1 R



g 10 R:



MAD 10 R:

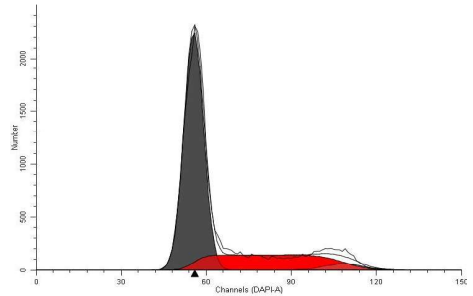


Abbildung 8: Ergebnisse der Durchflusszytometrie exemplarisch für einen Patienten. Y-Achse: Anzahl an erfassten Zellen; x-Achse: DAPI-Größensignal. g = gesund; MAD = Madelung; 0, 1 und 10 R = 0, 1 ng/ml und 10 ng/ml Rapamycin. Dunkelgraue Fläche = Zellen in G1-Phase; rote Fläche = Zellen in S-Phase; graue Fläche = Zellen in G2-Phase

Im Folgenden ist die prozentuale Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen dargestellt:

Bei Patient 1 stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase im gesunden Gewebe von 49,95% im unbehandelten Zustand auf 75,31% nach Rapamycinzugabe von 10 ng/ml, im von MSL betroffenen Gewebe stieg er ebenfalls von 55,20% auf 72,45%. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase sank hingegen unter dieser Behandlung im gesunden Gewebe von 15,50% auf 6,66%, im erkrankten Gewebe von 16,87% auf 6,29%. Ebenso fiel auch der Anteil der Zellen in der S-Phase von 34,55% auf 18,04% im Unbetroffenen und von 27,93% auf 21,26% im betroffenen Gewebe.

Bei Patient 2 stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase unter Rapamycinbehandlung mit 10 ng/ml im gesunden Gewebe von 40,96% auf 72,44%, im betroffenen Gewebe von 42,83% auf 69,81%. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase sank wiederum von 16,00% auf 0,48% im unbetroffenen Gewebe und von 10,81% auf 3,41% im erkrankten Gewebe. Auch in der S-Phase führte die Behandlung zu einem Abfall von 43,04% auf 27,09% im gesunden Gewebe und von 46,36% auf 26,71% im erkrankten Gewebe.

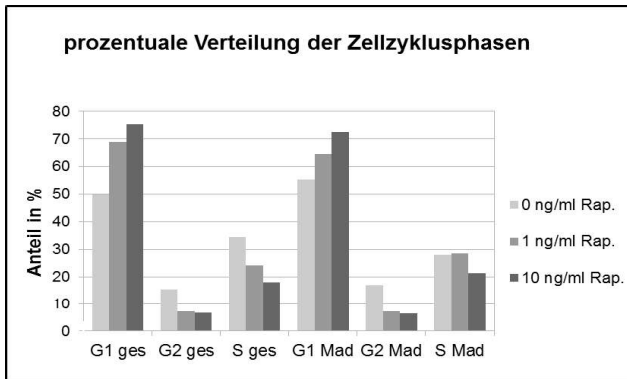
Patient 3 wies nach Rapamycinzugabe nur einen leichten Anstieg der Zellen in der G1-Phase von 64,39% auf 66,27% im gesunden Gewebe und von 53,31% auf 67,94% im betroffenen Gewebe auf. Der Abfall der Zellen in der G2-Phase unter der Behandlung fiel von 7,11% auf 5,67% im unbetroffenen Gewebe und von 8,76% auf 5,80% im Betroffenen ebenfalls etwas geringer aus. In der S-Phase kam es im gesunden Gewebe nur zu einem sehr leichten Abfall von 28,50% auf 28,06%, wohingegen der Abfall im Erkrankten von 37,93% auf 26,26% stärker ausgeprägt war.

Bei Patient 4 führte die Behandlung mit Rapamycin zu einem Anstieg der Zellen in der G1-Phase von 61,73% auf 78,71% im Unbetroffenen und von 60,16% auf 74,38% im betroffenen Gewebe. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase sank von 4,45% auf 3,21% im Gesunden und von 3,54% auf 2,72% im erkrankten Gewebe. Auch in der S-Phase ließ sich nach Rapamycinzugabe erneut ein Abfall der Zellen von 33,82% auf 25,01% im Unbetroffenen und von 36,30% auf 22,91% im betroffenen Gewebe feststellen.

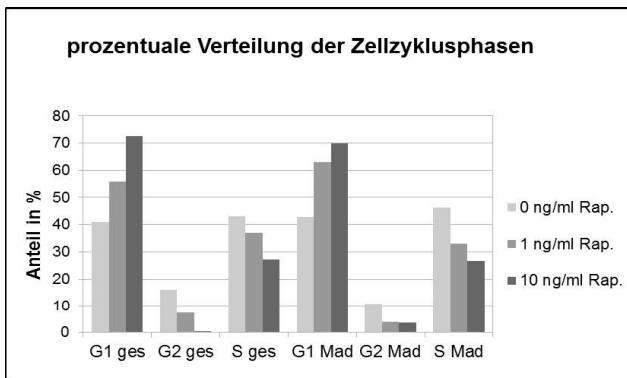
Patient 5 wies nach Behandlung mit Rapamycin einen Anstieg der Zellen in der G1-Phase von 53,58% auf 67,88% im Gesunden und von 55,84% auf 67,08% im erkrankten Gewebe auf. Bei diesem Patienten befanden sich im unbetroffenen Gewebe weder im Unbehandelten noch im behandelten Zustand Zellen in der G2-Phase. Im erkrankten Gewebe war ein leichter Anstieg der Zellen in dieser Phase von 0,07% auf 2,39% nach Rapamycinzugabe zu verzeichnen. In der S-Phase kam es im gesunden Gewebe zu einem Abfall von 46,52% auf

32,12% und im Erkrankten von 44,08% auf 30,52%.

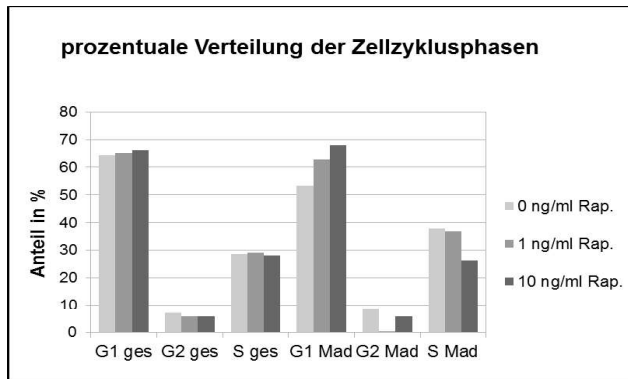
Patient 1:



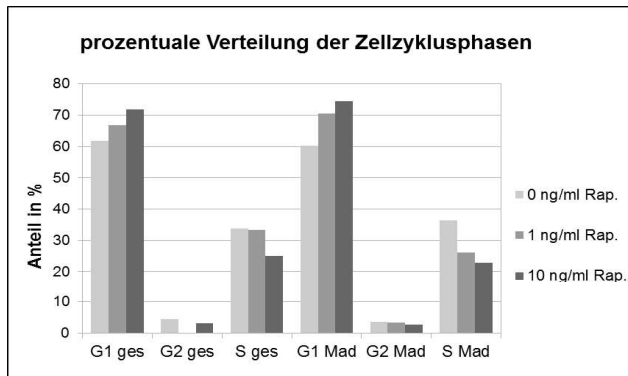
Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:



Patient 5:

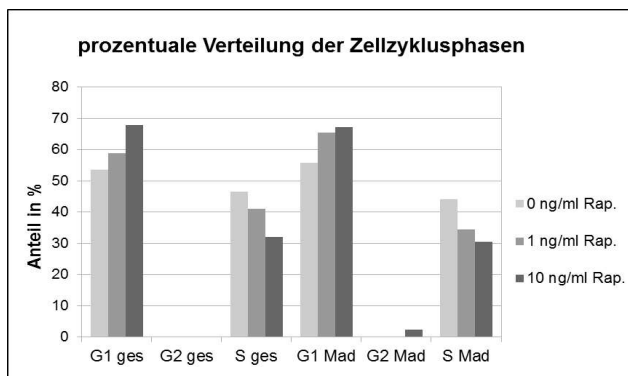


Abbildung 9: prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen nach 24-stündiger Behandlung mit Rapamycin; x-Achse: ges = Zellen aus gesundem Gewebe, MAD = Zellen aus Madelungsgewebe, G1 = Gap1-Phase, S = Synthese-Phase, G2 = Gap2-Phase; y-Achse: Anteil der einzelnen Phasen in %

5.3 PCR

Um die Expression bestimmter Gene v.a. Zielgene des mTOR-Signalweges von gesundem und erkranktem Gewebe im unbehandelten Zustand und unter Rapamycinexposition vergleichen zu können, wurden PCRs durchgeführt. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf EIF4EBP1 und RPS6K1, zwei Zielgene der Signalkaskade, aber auch mTOR selbst wurde untersucht.

5.3.1 EIF4EBP1

Bei den PCRs hat sich ergeben, dass EIF4EBP1 bei den mit Zellkulturmedium ohne Rapamycin behandelten Zellen aus gesundem Gewebe signifikant höher exprimiert war als bei den Zellen aus erkranktem Gewebe. Mit steigender Rapamycinzugabe konnte die Expression des Gens bei den erkrankten Zellen jedoch stufenweise stark angehoben werden, während die gleiche Behandlung bei den gesunden Zellen zu einem leichten Abfall der Expression führte.

Außerdem war zu beobachten, dass sich im Gegensatz zu den ausschließlich mit Zellkulturmedium behandelten Zellen, bei den Zellen, welche über sieben Tage hinweg adipogen differenziert worden waren, keine signifikanten Unterschiede zwischen Unbetroffenem und von MSL betroffenem Gewebe feststellen lassen konnten.

Im Folgenden die Ergebnisse der Zellen der aller 5 Patienten:

Bei Patient 1 lag der Wert für die relative Genexpression von EIF4EBP1 mit 2,60 bei den Zellen aus gesundem Gewebe deutlich höher als bei denen aus erkranktem Gewebe mit 1,11. Bei Letzteren ließ sich die Expression durch Rapamycinzugabe bis auf 3,70 bei 10 ng/ml steigern, bei den Zellen aus gesundem Gewebe war hingegen mit 2,37 ein leichter Abfall zu verzeichnen. Nach adipogener Differenzierung haben sich die Werte mit 0,92 für Zellen aus Unbetroffenem und 1,28 für Zellen aus betroffenem Gewebe deutlich weniger unterschieden. Die Behandlung mit 1 ng/ml Rapamycin führte in beiden Gewebearten zunächst zu einem Abfall der Genexpression und stieg bei 10 ng/ml wieder an.

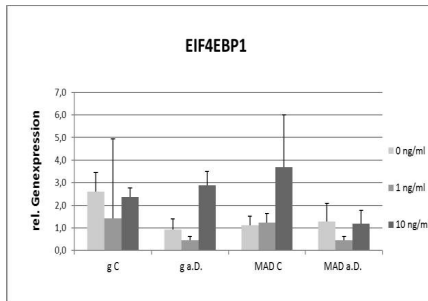
Patient 2 wies im unbehandelten Zustand ebenfalls eine deutlich höhere Expression von EIF4EBP1 im gesunden Gewebe mit 0,97 im Vergleich zum Erkrankten mit 0,35 auf. Bei den Zellen aus von MSL betroffenem Gewebe ließ sich die Expression durch Rapamycinzugabe bis auf 1,40 bei 10 ng/ml steigern, bei den Zellen aus gesundem Gewebe hingegen blieb sie mit 0,97 unverändert. Nach adipogener Differenzierung war der Unterschied zwischen beiden Gewebearten mit 0,76 für Gesundes und 0,48 für Erkranktes geringer als im undifferenzierten Zustand. Auch bei diesem Patienten führte die Behandlung mit 1 ng Rapamycin/ml bei beiden Gewebearten zunächst zu einem Abfall der Genexpression und stieg bei 10 ng/ml erneut leicht an.

Bei Patient 3 lag der Wert für die relative Genexpression von EIF4EBP1 mit 0,69 bei den Zellen aus gesundem Gewebe doppelt so hoch wie bei denen aus erkranktem Gewebe mit 0,34. Bei Letzteren ließ sich die Expression durch Rapamycinzugabe bis auf 0,96 bei 10 ng/ml steigern, bei den Zellen aus gesundem Gewebe war hingegen mit 0,64 ein leichter Abfall zu verzeichnen. Nach adipogener Differenzierung war die Genexpression im unbetroffenen Gewebe mit 0,58 niedriger als im Betroffenen mit 1,03. Die Behandlung mit Rapamycin führte hier bei beiden Gewebearten gleichermaßen zu einem Abfall der Expression.

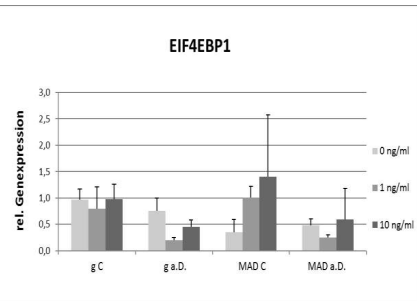
Patient 4 wies im unbehandelten Zustand ebenfalls eine etwas höhere Expression von EIF4EBP1 im gesunden Gewebe mit 0,78 im Vergleich zum Erkrankten mit 0,61 auf. Die Zugabe von Rapamycin führte bei diesem Patienten in beiden Gewebearten gleichermaßen zu einem Abfall der Genexpression auf 0,58 bei den Zellen aus Betroffenenem und auf 0,47 bei denen aus unbetroffenem Gewebe. Nach adipogener Differenzierung war der Wert für die Expression von EIF4EBP1 im gesunden Gewebe mit 0,60 höher als im Erkrankten mit 0,33 und fiel in beiden Fällen durch Behandlung mit Rapamycin deutlich ab.

Bei Patient 5 lag der Wert für die relative Genexpression von EIF4EBP1 mit 1,37 bei den Zellen aus gesundem Gewebe deutlich höher als bei denen aus betroffenem Gewebe mit 0,80. Bei Letzteren ließ sich die Expression durch Rapamycinzugabe bis auf 1,27 bei 10 ng/ml steigern, bei den Zellen aus gesundem Gewebe war hingegen mit 1,31 ein leichter Abfall zu verzeichnen. Nach adipogener Differenzierung war die Genexpression im unbetroffenen Gewebe mit 0,68 deutlich niedriger als im Betroffenen mit 2,36. Die Behandlung mit Rapamycin führte hier bei beiden Gewebearten gleichermaßen zu einem Abfall der Expression von EIF4EBP1.

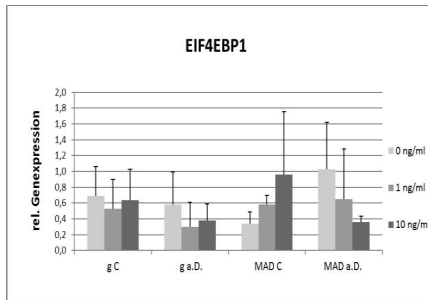
Patient 1:



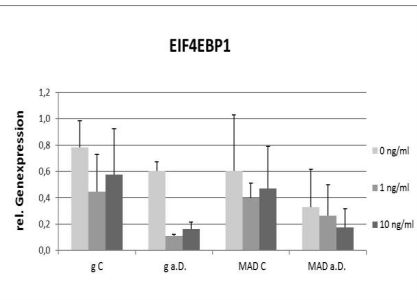
Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:



Patient 5:

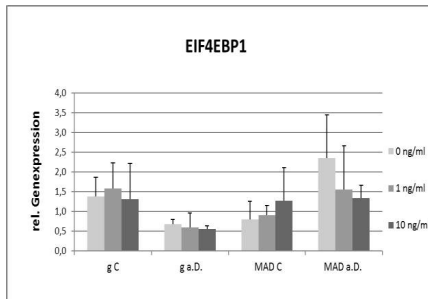


Abbildung 4: Relative Genexpression von EIF4EBP1; x-Achse: g = Zellen aus gesundem Gewebe, MAD = Zellen aus Madelunggewebe, C = Zellkulturmedium, a.D. = adipogenes Differenzierungs- medium; y-Achse: relative Genexpression; Legende: Rapamycinkonzentrationen in ng/ml. Aus Triplikaten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet.

5.3.2 RPS6K1

Insgesamt zeichnete sich hier ein sehr ähnliches Bild ab wie bei EIF4EBP1. Bei den Patienten war die Expression des Gens bei den Zellen aus gesundem Gewebe, die ausschließlich mit Zellkulturmedium behandelt worden waren, deutlich höher als bei denen aus Erkranktem mit derselben Behandlung. Auch ließ sich bei den Zellen aus von MSL betroffenem Gewebe die Expression des Gens durch Rapamycinzugabe stufenweise stark steigern, während es hierdurch bei den gesunden Zellen entweder zu einem Abfall der Expression kam oder diese nahezu unverändert blieb. Auch hier fielen erneut nach adipogener Differenzierung deutlich geringere Unterschiede zwischen gesundem und erkranktem Gewebe auf als vor der Differenzierung.

Im Folgenden die Ergebnisse der Zellen aller 5 Patienten:

Bei Patient 1 war die Expression von RPS6K1 im unbehandelten Zustand bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 10,62 mehr als doppelt so hoch wie bei denen aus Erkranktem mit 4,49. Bei Letzteren ließ sie sich jedoch durch Rapamycinzugabe sehr deutlich bis auf 34,23 bei 10ng/ml steigern, wohingegen bei den Zellen aus unbetroffenem Gewebe mit 17,86 nur ein leichter Anstieg zu verzeichnen war. Nach adipogener Differenzierung war der Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Gewebearten mit 12,76 im Gesunden und 10,24 im erkrankten Gewebe deutlich geringer als bei den undifferenzierten Zellen.

Patient 2 wies im unbehandelten Zustand eine deutlich höhere Expression von RPS6K1 bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 12,70 im Vergleich zu denen aus betroffenem Gewebe mit 2,67 auf. Während im erkrankten Gewebe die Genexpression unter Rapamycinzugabe bis auf 15,12 bei 10ng/ml stark anstieg, führte dieselbe Behandlung im unbetroffenen Gewebe zu einem deutlichen Abfall auf 3,34. Nach adipogener Differenzierung war zwischen beiden Gewebearten erneut nur ein geringer Unterschied in der Genexpression mit 14,91 im Gesunden und 12,41 im erkrankten Gewebe festzustellen. Die Zugabe von Rapamycin führte hier in beiden Fällen zu einem stufenweisen Abfall der Genexpression.

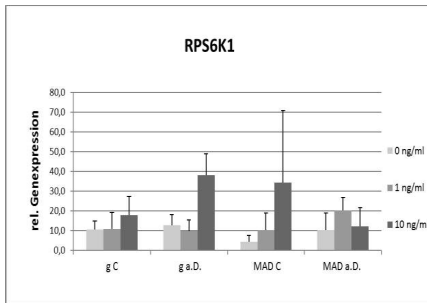
Bei Patient 3 war die Expression von RPS6K1 im unbehandelten Zustand bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 1,18 ebenfalls deutlich höher als bei denen aus Erkranktem mit 0,43. Im betroffenen Gewebe führte die Zugabe von Rapamycin zu einem deutlichen Anstieg bis auf 3,04 bei 10 ng/ml, wohingegen bei derselben Behandlung im gesunden Gewebe ein Abfall der Genexpression auf 0,54 zu verzeichnen war. Bei diesem Patienten war der Wert für die Zellen aus unbetroffenem Gewebe nach adipogener Differenzierung mit 3,49 deutlich höher als bei den Zellen aus Betroffenem. Die Behandlung mit Rapamycin führte im gesunden

Gewebe zu einem leichten Abfall und im Erkrankten zu einem deutlichen Anstieg.

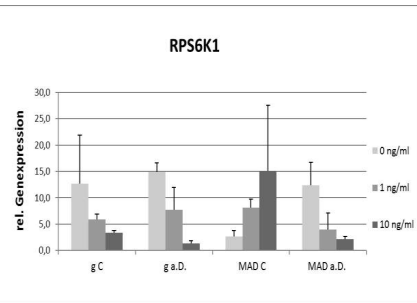
Patient 4 wies im unbehandelten Zustand eine deutlich höhere Expression von RPS6K1 bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 1,17 im Vergleich zu denen aus betroffenem Gewebe mit 0,72 auf. Während im erkrankten Gewebe die Genexpression unter Rapamycinzugabe auf 1,12 bei 10ng/ml anstieg, führte dieselbe Behandlung im unbetroffenen Gewebe zu einem leichten Abfall auf 0,93. Nach adipogener Differenzierung lag der Wert im unbehandelten Zustand bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 1,46 deutlich über dem derjenigen aus erkranktem Gewebe mit 0,77. Die Zugabe von Rapamycin führte bei beiden Gewebearten zu einem stufenweisen Anstieg der Genexpression.

Bei Patient 5 war die Expression von RPS6K1 im unbehandelten Zustand bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 1,55 ebenfalls deutlich höher als bei denen aus betroffenem Gewebe mit 0,50. Im erkrankten Gewebe führte die Zugabe von Rapamycin zu einem leichten Anstieg auf 0,62 bei 10ng/ml, wohingegen bei derselben Behandlung im gesunden Gewebe ein leichter Abfall der Genexpression auf 1,18 zu verzeichnen war. Im differenzierten Zustand war der Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Gewebearten mit 0,91 im Gesunden und 1,28 im erkrankten Gewebe deutlich geringer als im undifferenzierten Zustand. Die Behandlung mit Rapamycin hatte bei beiden Gewebearten zunächst einen Anstieg der Genexpression bei der Konzentration 1 ng/ml zur Folge und fiel bei 10 ng/ml wieder ab.

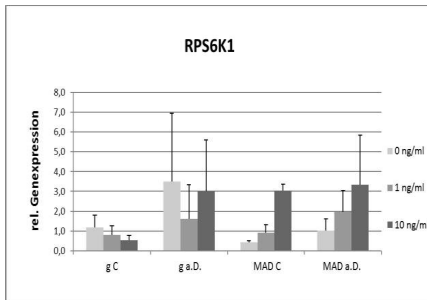
Patient 1:



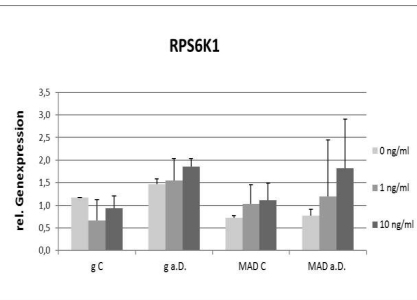
Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:



Patient 5:

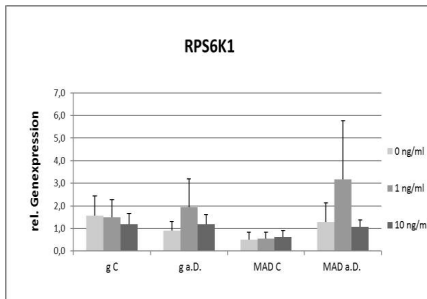


Abbildung 5: Relative Genexpression von RPS6K1; Achsenbeschriftung und Legende siehe Abbildung 4. Aus Triplikaten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet.

5.3.3 mTOR

Die oben beschriebenen Tendenzen ließen sich auch für mTOR selbst, einem weiteren Gen des mTOR-Signalweges feststellen.

Im Folgenden die Ergebnisse der Zellen von 4 Patienten:

Bei Patient 1 lag die Expression von mTOR im unbehandelten Zustand bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 5,89 deutlich höher als bei denen aus Erkranktem mit 1,06. Bei Letzeren stieg der Wert unter Rapamycinbehandlung bis auf 8,26 stark an, während der Anstieg bei den Zellen aus unbetroffenem Gewebe mit 8,15 bezogen auf den höheren Ausgangswert geringer ausfiel. Nach adipogener Differenzierung war der Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Gewebearten mit 3,28 im Gesunden und 0,92 im erkrankten Gewebe deutlich geringer als bei den undifferenzierten Zellen. Auf Rapamycinzugabe reagierten beide Arten von Zellen mit einem Anstieg der Expression von mTOR, welcher jedoch im unbetroffenen Gewebe deutlich stärker ausfiel.

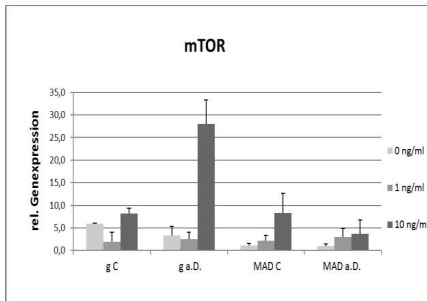
Patient 2 zeigte im unbehandelten Zustand mit 3,20 im gesunden Gewebe ebenfalls eine deutlich stärkere Genexpression als im betroffenen Gewebe mit 1,37. Während sich der Wert durch Rapamycinzugabe bei den Zellen aus erkranktem Gewebe stark bis auf 13,42 steigerte, fiel er im gesunden Gewebe unter derselben Behandlung auf 1,79 ab. Im adipogen differenzierten Zustand lag die Expression im unbetroffenen Gewebe bei 5,81 und im Betroffenen bei 4,12. Hier reagierten beide Arten von Zellen gleichermaßen mit einem Abfall unter steigender Rapamycinzugabe.

Bei Patient 3 lag die Expression von mTOR im unbehandelten Zustand bei den Zellen aus gesundem Gewebe mit 2,60 höher als bei denen aus Erkranktem mit 1,88. Bei Letzeren stieg der Wert unter Rapamycinbehandlung bis auf 3,87 deutlich an, wohingegen er bei den Zellen aus unbetroffenem Gewebe auf 1,27 abfiel. Bei diesem Patienten verhielten sich die Zellen nach adipogener Differenzierung ähnlich wie die Undifferenzierten. Hier war die Genexpression bei den Zellen aus unbetroffenem Gewebe mit 6,93 deutlich höher als bei denen aus Betroffenen mit 3,71. Während im gesunden Gewebe unter Rapamycinbehandlung ein Abfall zu verzeichnen war, kam es im Erkrankten zu einem Anstieg der Expression von mTOR.

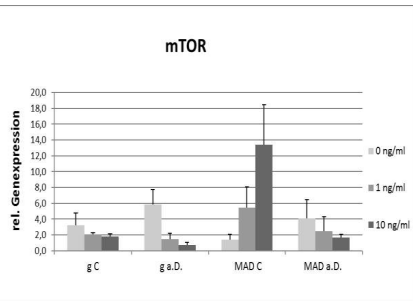
Patient 4 wies im unbehandelten Zustand mit 0,95 im gesunden Gewebe ebenfalls eine deutlich stärkere Genexpression auf als im betroffenen Gewebe mit 0,42. Bei den Zellen aus erkranktem Gewebe steigerte sich der Wert durch Rapamycinzugabe bis auf 0,71, im gesunden Gewebe erfolgte ein bezogen auf den höheren Ausgangswert nur leichter Anstieg

auf 1,15. Nach adipogener Differenzierung wiesen die Zellen beider Gewebearten im unbehandelten Zustand einen geringeren Unterschied in ihrer Genexpression mit 0,54 im Unbetroffenen und 0,66 im betroffenen Gewebe auf. Eine Rapamycinzugabe von 1 ng/ml führte bei beiden Gewebearten gleichermaßen zu einem deutlichen Anstieg der Expression von mTOR und führte bei einer Steigerung der Konzentration auf 10 ng/ml wieder zu einem Abfall.

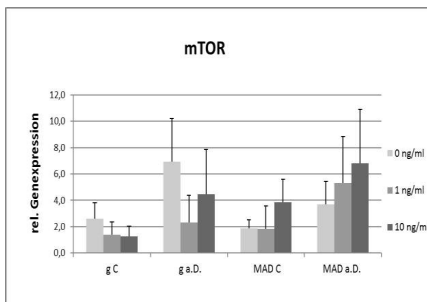
Patient 1:



Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:

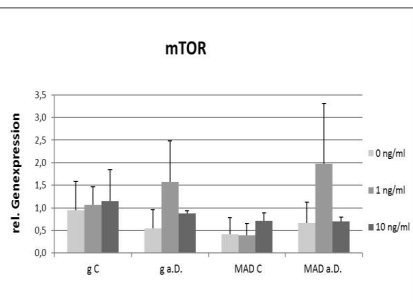


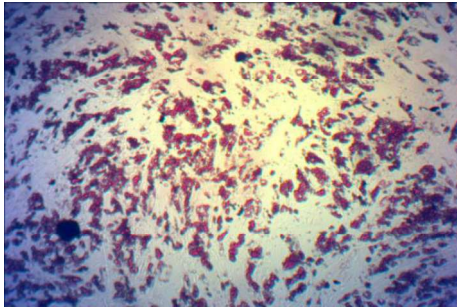
Abbildung 6: Relative Genexpression von mTOR; Achsenbeschriftung und Legende siehe Abbildung 4. Aus Triplikaten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet.

5.4 Oil-Red Färbung

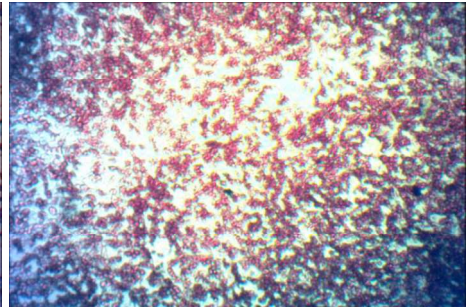
Bei der Oil Red Färbung hatten diejenigen Zellen, welche ausschließlich mit Zellkulturmedium behandelt worden waren, bei beiden Gewebearten kaum Fetttröpfchen gebildet. Bei den anderen Zellen, welche adipogenes Differenzierungsmedium erhalten hatten, waren in den gesunden Zellen mehr Lipidtröpfchen eingelagert als in den Madelungzellen. Auffällig war auch, dass durch Zugabe von Rapamycin der Gehalt an Lipidbestandteilen in den Zellen nur noch sehr leicht gesenkt werden konnte, was an der etwas geringeren Menge an ausgewaschenem Farbstoff deutlich wird.

Im Folgenden sind exemplarisch die lichtmikroskopischen Aufnahmen eines Patienten dargestellt:

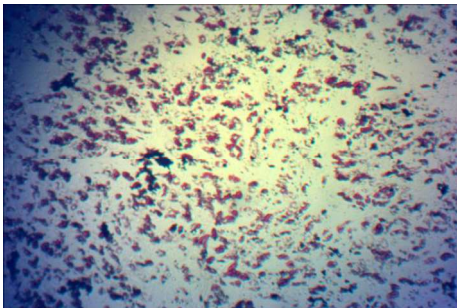
g 0 R



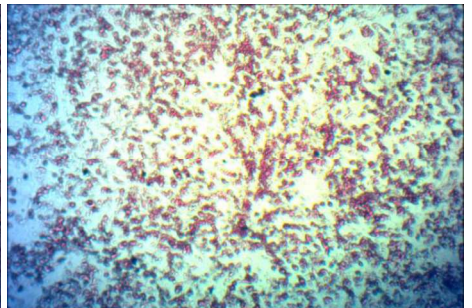
MAD 0 R



g 1 R:



MAD 1 R:



g 10 R:

MAD 10 R:

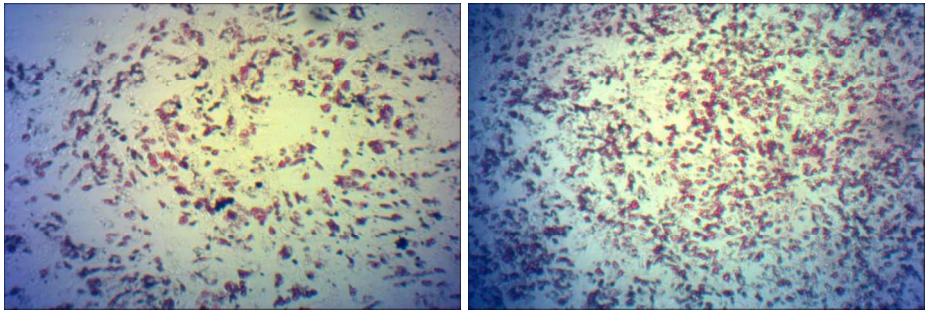


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Oil Red Färbung von Adipozyten eines Patienten nach 3-wöchiger adipogener Differenzierung. g = gesund; MAD = Madelung; 0, 1 und 10 R = 0, 1 ng/ml und 10 ng/ml Rapamycin.

Im Folgenden ist der normalisierte Differenzierungsgrad der Zellen nach 3-wöchiger adipogener Differenzierung dargestellt:

Bei Patient 1 war der normalisierte Differenzierungsgrad der Zellen, welche nur mit Kontrollmedium behandelt worden waren, sowohl im gesunden Gewebe mit 0,70 als auch im Erkrankten mit 0,98 im Vergleich zu den differenzierten Zellen sehr gering. Nach Behandlung mit adipogenem Differenzierungsmedium lag der Wert im unbetroffenen Gewebe mit 5,23 deutlich über dem im Betroffenen mit 3,66. Die Zugabe von Rapamycin führte bei beiden Arten von Zellen zu einem leichten Abfall auf 4,59 im gesunden Gewebe und auf 3,45 im Erkrankten bei 10 ng/ml.

Für Patient 2 ergaben sich bei den Zellen aus Kontrollmedium mit 1,00 im gesunden Gewebe und 0,97 im Erkrankten ebenfalls deutlich niedrigere Werte für den Differenzierungsgrad als bei denen aus adipogenem Differenzierungsmedium. Bei Letzteren lag der Wert der Zellen aus betroffenem Gewebe mit 2,75 wieder unter dem der Zellen aus unbetroffenem Gewebe mit 3,38. Durch die Behandlung mit Rapamycin kam es im erkrankten Gewebe zu einem leichten Anstieg auf 3,16, während im gesunden Gewebe ein Abfall auf 3,07 bei 10 ng/ml zu verzeichnen war.

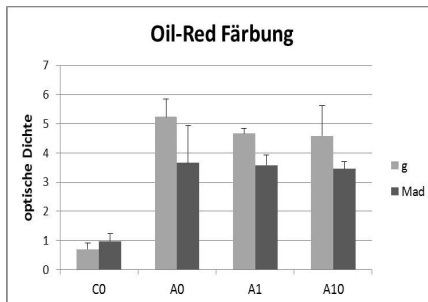
Bei Patient 3 war der normalisierte Differenzierungsgrad der Zellen, welche nur mit Kontrollmedium behandelt worden waren, erneut sowohl im gesunden Gewebe mit 0,44 als auch im Erkrankten mit 0,60 im Vergleich zu den differenzierten Zellen sehr gering. Nach Behandlung mit adipogenem Differenzierungsmedium lag der Wert im unbetroffenen Gewebe mit 4,34 deutlich über dem im Betroffenen mit 3,47. Die Zugabe von Rapamycin führte bei

den Zellen beider Gewebearten zu einem leichten Abfall auf 4,01 im gesunden Gewebe und auf 3,16 im Erkrankten bei 10 ng/ml.

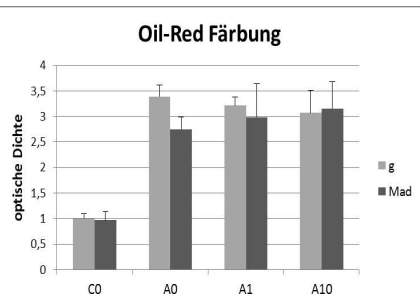
Patient 4 wies bei den Zellen aus Kontrollmedium mit 1,69 im gesunden Gewebe und 1,39 im Erkrankten ebenfalls deutlich niedrigere Werte für den Differenzierungsgrad auf als bei denen aus adipogenem Differenzierungsmedium. Bei diesen lag der Wert der Zellen aus betroffenem Gewebe mit 3,28 auch bei diesem Patienten unter dem der Zellen aus unbetroffenem Gewebe mit 4,10. Durch die Behandlung mit Rapamycin kam es im erkrankten Gewebe zu einem leichten Anstieg auf 3,53, während im gesunden Gewebe ein Abfall auf 3,58 bei 10 ng/ml zu verzeichnen war.

Bei Patient 5 war der normalisierte Differenzierungsgrad der Zellen, welche nur mit Kontrollmedium behandelt worden waren, erneut sowohl im gesunden Gewebe mit 1,60 als auch im Erkrankten mit 1,82 im Vergleich zu den differenzierten Zellen sehr gering. Nach Behandlung mit adipogenem Differenzierungsmedium lag der Wert im unbetroffenen Gewebe mit 5,83 bei diesem Patienten etwas unter dem Wert im Betroffenen mit 5,93. Die Zugabe von Rapamycin führte bei den Zellen aus erkranktem Gewebe zu einem leichten Abfall auf 5,44 bei 10 ng/ml, während dieselbe Behandlung im gesunden Gewebe zu einem sehr leichten Anstieg auf 5,86 führte.

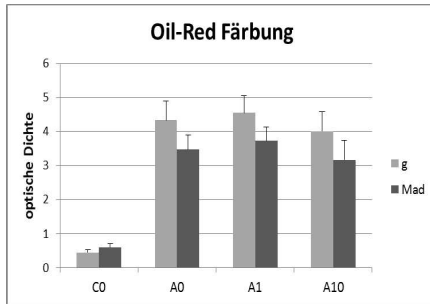
Patient 1:



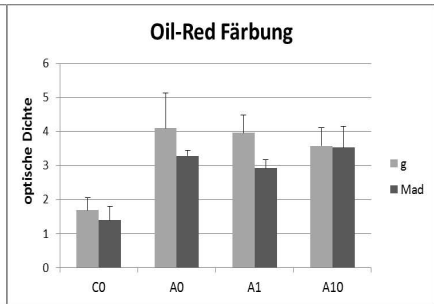
Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:



Patient 5:

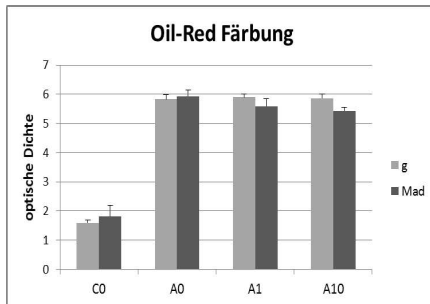


Abbildung 11: normalisierter Differenzierungsgrad nach 3-wöchiger adipogener Differenzierung; y-Achse: optische Dichte; x-Achse: C0 = Zellkulturmedium ohne Rapamycin, A0 = adipogenes Differenzierungsmedium ohne Rapamycin, A1 = adipogenes Differenzierungsmedium mit 1 ng/ml Rapamycin, A10 = adipogenes Differenzierungsmedium mit 10 ng/ml Rapamycin; y-Achse: normalisierter Differenzierungsgrad; Legende: g = Zellen aus gesundem Gewebe, MAD = Zellen aus Madelunggewebe. Es wurden jeweils vier Wiederholungen gebildet, von denen der Mittelwert und die Standardabweichung gezeigt sind.

5.5 Lipolyse-Assays

Im Rahmen der Lipolyse-Assays wurde die Lipolyse bei den Adipozyten auf zwei verschiedene Arten stimuliert, zum Einen direkt über cAMP und zum Anderen über den β -Adrenorezeptor durch Isoprotenerol. Sowohl bei Gesundem als auch bei erkranktem Gewebe hat sich ergeben, dass durch Stimulation mit cAMP deutlich mehr Triglyceride freigesetzt werden konnten als durch Isoprotenerol.

Des Weiteren hat sich ergeben, dass aus den Zellen aus erkranktem Gewebe bei beiden Induktoren mindestens ähnlich hohe Mengen an Lipiden freigesetzt werden konnten wie aus den Zellen aus gesundem Gewebe, teilweise sogar noch deutlich mehr. Eine Blockade des mTOR-Signalweges in Form von Rapamycinzugabe führte bei den Zellen aus beiden Gewebearten und bei beiden Induktoren zu einem stufenweisen Abfall der Lipolyseaktivität.

Im Folgenden ist die Lipolyseaktivität aller fünf Patienten nach 3-wöchiger Differenzierung dargestellt:

Bei Patient 1 war die Lipolyseaktivität nach Stimulation mit cAMP im betroffenen Gewebe mit 12,20 deutlich höher als im Gesunden mit 4,83. Nach Induktion der Lipolyse durch Isoprotenerol fielen die Werte geringer aus, aber auch hier wurden aus den Zellen aus erkranktem Gewebe mit einem Wert von 8,18 im Vergleich zu 1,00 bei den Zellen aus gesundem Gewebe deutlich mehr Lipide freigesetzt. Die Behandlung mit Rapamycin führte bei beiden Induktoren und Gewebearten zu einem stufenweisen Abfall der Lipolyseaktivität. Bei cAMP kam es im unbetroffenen Gewebe zu einem Abfall auf 3,70 und im Betroffenen auf 7,64 bei 10 ng Rapamycin/ml. Bei Isoprotenerol war im gesunden Gewebe ebenfalls ein Abfall auf 0,41 und im Erkrankten auf 2,28 zu verzeichnen.

Patient 2 wies nach Stimulation mit cAMP ebenfalls eine höhere Lipolyseaktivität im betroffenen Gewebe mit 3,44 auf als im Unbetroffenen mit 2,73. Auch nach Induktion der Lipolyse durch Isoprotenerol konnten aus den Zellen aus erkranktem Gewebe mit 1,23 im Vergleich zu denen aus gesundem Gewebe mit 1,00 etwas mehr Lipide freigesetzt werden. Durch Zugabe von Rapamycin kam es bei den Zellen, die durch cAMP stimuliert worden waren, zu einem Abfall auf 1,39 im betroffenen Gewebe und auf 2,09 im Unbetroffenen bei 10 ng/ml. Bei Isoprotenerol sanken die Werte auf 0,86 im Erkrankten und auf 0,90 im gesunden Gewebe.

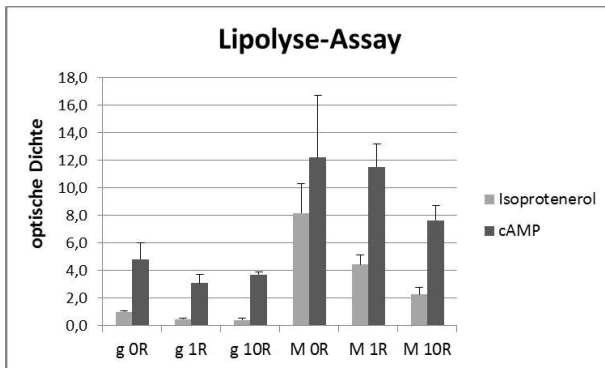
Bei Patient 3 war die Lipolyseaktivität nach Stimulation mit cAMP im betroffenen Gewebe mit 5,66 erneut höher als im gesunden Gewebe mit 4,67. Nach Induktion der Lipolyse durch

Isoprotenerol fielen die Werte geringer aus, aber auch hier wurden aus den Zellen aus erkranktem Gewebe mit einem Wert von 2,59 im Vergleich zu 1,00 bei den Zellen aus gesundem Gewebe deutlich mehr Lipide freigesetzt. Die Behandlung mit Rapamycin führte bei beiden Induktoren und Gewebearten zu einem stufenweisen Abfall der Lipolyseaktivität. Bei cAMP kam es im unbetroffenen Gewebe zu einem Abfall auf 3,13 und im Betroffenen auf 3,46 bei 10 ng Rapamycin/ml. Bei Isoprotenerol war im gesunden Gewebe ebenfalls ein Abfall auf 0,76 und im Erkrankten auf 1,10 zu verzeichnen.

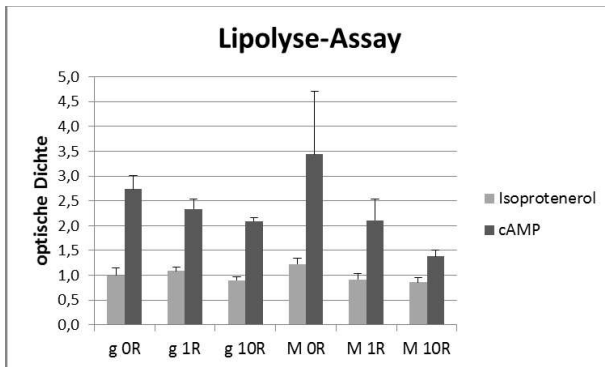
Bei Patient 4 war die Lipolyseaktivität nach Stimulation mit cAMP im gesunden Gewebe mit 5,31 etwas höher als im Betroffenen mit 4,43. Nach Induktion der Lipolyse durch Isoprotenerol hingegen setzten die Zellen aus erkranktem Gewebe mit 1,76, wie bei allen anderen Patient auch, mehr Lipide frei als diejenigen aus Gesundem mit 1,00. Durch Zugabe von Rapamycin kam es bei den Zellen, die durch cAMP stimuliert worden waren, zu einem Abfall auf 2,20 im betroffenen Gewebe und auf 1,95 im Unbetroffenen bei 10 ng/ml. Bei Isoprotenerol sanken die Werte auf 0,88 im Erkrankten und auf 0,41 im gesunden Gewebe.

Patient 5 wies nach Stimulation mit cAMP erneut eine deutlich höhere Lipolyseaktivität im betroffenen Gewebe mit 6,49 auf als im Unbetroffenen mit 4,15. Auch nach Induktion der Lipolyse durch Isoprotenerol konnten aus den Zellen aus erkranktem Gewebe mit 2,38 im Vergleich zu denen aus gesundem Gewebe mit 1,00 etwas mehr Lipide freigesetzt werden. Durch Zugabe von Rapamycin kam es bei den Zellen, die durch cAMP stimuliert worden waren, zu einem Abfall auf 5,56 im betroffenen Gewebe und auf 2,92 im Unbetroffenen bei 10 ng/ml. Bei Isoprotenerol war im erkrankten Gewebe ebenfalls ein Abfall auf 1,26 und im Gesunden auf 0,67 zu verzeichnen.

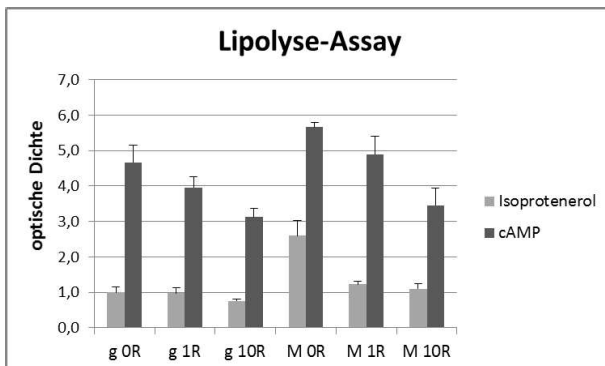
Patient 1:



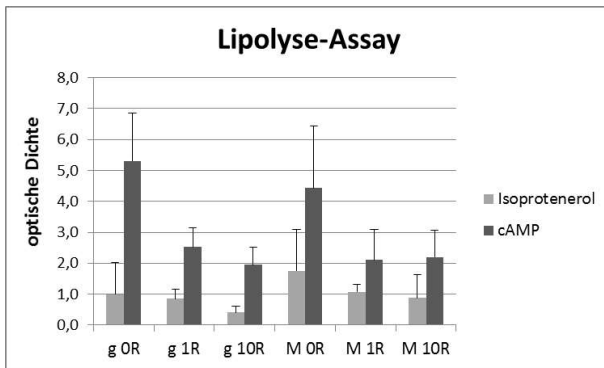
Patient 2:



Patient 3:



Patient 4:



Patient 5:

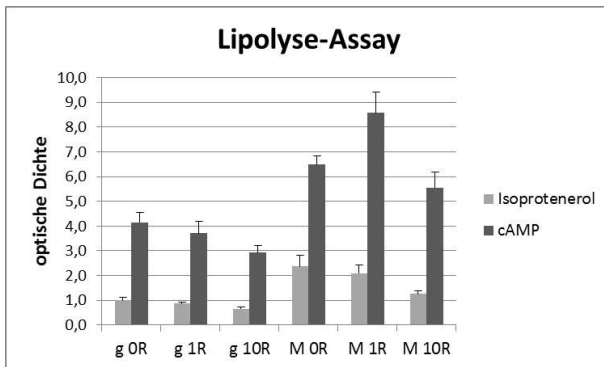


Abbildung 12: Lipolyseaktivität der Zellen aus gesundem und erkranktem Gewebe. g = gesund; M = Madelung; 0R = kein Rapamycin; 1R = 1 ng/ml Rapamycin; 10R = 10 ng/ml Rapamycin

6. Diskussion

6.1 Vitalitätstests mit Resazurin

Die Vitalitätstests mit Resazurin geben Aufschluss über die Stoffwechselaktivität der Zellen, da diese direkt mit der Menge an umgesetztem Farbstoff korreliert. Die deutlich höhere Aktivität der Zellen aus von MSL betroffenem Gewebe im Vergleich zu denen aus gesundem Gewebe, die sich bei den Messungen ergeben hat, begünstigt deren ausgeprägteres Zellwachstum und auch ihre höheren Proliferationsraten. Durch Rapamycinzugabe ließ sich die Stoffwechselaktivität sowohl in gesundem als auch in erkranktem Gewebe signifikant senken, wobei diese Tendenz bei den Zellen in betroffenem Gewebe prozentual zu deren höherem Ausgangswert deutlich stärker war. Es konnte also gezeigt werden, dass durch Rapamycin und somit durch Blockade des mTOR-Signalweges die Stoffwechselaktivität stark gesenkt wird. Auffällig war hierbei auch, dass die Aktivität bei steigenden Rapamycinkonzentrationen bis 1 ng/ml stufenweise abfiel, während höhere Konzentrationen keinen weiteren Abfall mehr auslösen konnten. Bei 1 ng/ml Rapamycin scheinen die Zellen in ihrer Aktivität also bereits maximal gehemmt zu sein.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in einer experimentellen Arbeit gemacht werden, in welcher die Sensibilität verschiedener Brustkrebszelllinien gegenüber Rapamycin untersucht wurde. Hierzu wurde die Stoffwechselaktivität der einzelnen Zelllinien mit Hilfe eines MTT-Assays (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid-Assay) sowohl mit als auch ohne der Zugabe von Rapamycin gemessen. Des Weiteren wurde unter diesen Bedingungen auch die DNA-Syntheseaktivität der Zellen mit Hilfe eines Thymidine Incorporation Assays gemessen. Mit Ausnahme zweier Zelllinien zeigten alle Zellen unter Behandlung mit Rapamycin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen sowohl eine geringere Stoffwechselaktivität als auch eine geringere DNA-Syntheseaktivität (Noh et al, 2004). In einer weiteren unabhängigen Arbeit wurden ebenfalls Zellen aus Brustkrebsgewebe über fünf Tage hinweg mit Rapamycin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und anschließend die Zellproliferation mit einem SRB-Assay gemessen. Auch hierbei hat sich eine deutliche Abnahme des Zellwachstums durch das Immunsuppressivum gezeigt, wobei dessen inhibitorischer Effekt bereits bei geringen Konzentrationen bis 1nM, wie in der vorliegenden Arbeit, annähernd sein Maximum erreicht hatte, während höhere Konzentrationen nur noch zu geringem weiterem Abfall der Zellproliferation führten (Akcanat et al, 2009). Diese Beobachtungen lassen sich gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinen, da zum

Einen auch hier eine geringere Stoffwechselaktivität der mit Rapamycin behandelten Zellen nachgewiesen werden konnte und dies zum Anderen auch auf eine geringere Gesamtzahl an Zellen in den mit Rapamycin behandelten wells zurückgeführt werden könnte, da hier die Proliferationsraten aufgrund der geringeren DNA-Syntheseaktivität niedriger zu sein scheinen.

6.2 FACS (Durchflusssytometrie)

Bei der Analyse der Zellzyklusphasen konnte erneut der inhibitorische Effekt von Rapamycin auf die Zellproliferation gezeigt werden, da sowohl bei den Zellen aus Gesundem als auch aus erkranktem Gewebe durch Rapamycinzugabe der Anteil der Zellen in der G1-Phase stufenweise anstieg, während derer der Zellen in der S- und der G2-Phase, also den Phasen während der Proliferation, sank.

Allerdings verhielten sich Zellen aus von MSL betroffenem Gewebe und aus gesundem Gewebe sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach Rapamycinzugabe sehr ähnlich. Demnach lassen sich anhand dieser Methode keine erhöhten Proliferationsraten im erkrankten Gewebe nachweisen.

Jedoch lassen sich diese Ergebnisse gut mit den Resultaten einer weiteren experimentellen Arbeit der Universität Erlangen-Nürnberg vergleichen. Hier wurden Brustkrebszellen unter anderem mit dem Rapamycin-Analogon RAD001 (Everolimus, Afinitor) behandelt und deren Verteilung in die einzelnen Zellzyklusphasen mit derer unbehandelter Zellen verglichen. Auch hier ließ sich ein verstärkter G1-Zellzyklusarrest bei den mit RAD001 behandelten Zellen feststellen, wohingegen der Anteil der Zellen in der S- und der G2-Phase deutlich abfiel (Brandt, 2011).

6.3 PCR

Bei den PCRs lag der Hauptaugenmerk auf den beiden Zielgenen des mTOR-Signalweges, EIF4EBP1 und RPS6K1 sowie mTOR selbst.

6.3.1 EIF4EBP1

Aus den Ergebnissen der PCRs wurde ersichtlich, dass die Zellen aus betroffenem Gewebe im undifferenzierten Zustand eine deutlich geringere Expression von EIF4EBP1 aufweisen als Zellen aus gesundem Fettgewebe. Dies könnte eine Rolle für das erhöhte Zellwachstum und die Proliferation der Zellen aus erkranktem Gewebe spielen, denn je weniger Bindeprotein vorhanden ist, desto geringer sind die inhibitorischen Effekte auf EIF4E und somit letztlich auf den Translationsmechanismus. Diesen hemmenden Effekt übt das Protein im dephosphorylierten Zustand durch Bindung von EIF4E aus, wohingegen seine Phosphorylierung durch mTOR über die Freisetzung dieses Faktors die Translation fördert (Gingras et al, 2001b). Wird mTOR jedoch durch Rapamycin gehemmt, so steigt die Rate an dephosphoryliertem EIF4EBP1 (Gingras et al, 1999; Gingras et al, 2001a) und somit auch dessen inhibitorischer Einfluss auf Zellproliferation und -wachstum. Allerdings scheinen sich die Effekte des Immunsuppressivums nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf Ebene der Genexpression abzuspielen. Dies lässt sich gut mit den Ergebnissen aus den PCR-Analysen dieser Arbeit in Verbindung bringen, welche bei den Zellen aus betroffenem Gewebe eine signifikante Steigerung der Genexpression von EIF4EBP1 durch Rapamycinzugabe zeigen konnten. Somit scheint eine Inhibition des mTOR-Signalweges die hemmenden Effekte von EIF4EBP1 sowohl auf Genebene durch erhöhte Expression zu fördern, als auch auf Proteinebene durch vermehrte Dephosphorylierung des Bindeproteins. Letztlich spricht die Tatsache, dass sich die Zellen aus erkranktem Gewebe durch Rapamycinzugabe in ihrer Genexpression den Adipozyten aus gesundem Gewebe immer stärker annähern bzw. diese sogar übersteigen für einen Hinweis auf eine Störung der mTOR-Signaltransduktionskaskade in den Zellen aus betroffenem Fettgewebe.

Ein weiterer auffälliger Punkt war, dass sich die adipogen differenzierten Zellen aus Magelungewebe im Gegensatz zu den Undifferenzierten in ihrer Genexpression kaum von den Zellen aus gesundem Gewebe unterscheiden haben und sich auch bei Rapamycinzugabe ähnlich verhielten. Diese Beobachtung kann als Hinweis dafür dienen, dass die Ursachen für

die erhöhte Proliferation und das gesteigerte Zellwachstum eher auf Stammzellebene und weniger auf Ebene der ausgereiften Adipozyten zu finden sind.

6.3.2 RPS6K1

Die PCR-Ergebnisse von RPS6K1 waren denen von EIF4EBP1 sehr ähnlich. Auch hier war die Expression des Gens bei den undifferenzierten Zellen aus erkranktem Gewebe deutlich geringer als bei denen aus Gesunden. Dies scheint in gewisser Weise zunächst einen Widerspruch darzustellen, da RPS6K1 durch mTOR aktiviert wird und einen fördernden Einfluss auf die Proteinsynthese und den Translationsmechanismus hat. Da aber die eigentliche Regulation, die Phosphorylierung von RPS6K1, auf Proteinebene stattfindet, könnte auch hier eine Störung vorliegen, die einen Einfluss auf die erhöhte Proliferation des betroffenen Gewebes ausübt.

Allerdings lassen die Ergebnisse unabhängig davon darauf schließen, dass im erkrankten Gewebe eine Regulation des Gens vorliegt, welche in Verbindung mit dem mTOR-Signalweg gebracht werden kann. Dies wird daran ersichtlich, dass eine Blockade der Signaltransduktion durch Rapamycin bei den betroffenen Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Genexpression führte. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von Rapamycin bei den gesunden Zellen entweder zu einem Abfall der Genexpression oder sie blieb annähernd unverändert.

Auch hier ließ sich erneut beobachten, dass die differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe hinsichtlich ihrer Genexpression kaum Unterschiede zu den Zellen aus gesundem Gewebe aufzuweisen scheinen. Dies könnte erneut darauf hindeuten, dass die pathologischen Prozesse im erkrankten Gewebe bereits vor dessen Ausreifung stattfinden.

In einer anderen Arbeit, in der die TOR-Aktivität in Pflanzenzellen der Gattung *Arabidopsis* im Fokus stand, wurde unter anderem der Phosphorylierungszustand des S6K-Proteins sowohl unter Behandlung mit Rapamycin als auch im unbehandelten Zustand untersucht. Hierbei hat sich ergeben, dass durch Inhibition von mTOR durch das Immunsuppressivum die Rate an phosphoryliertem und somit aktiviertem S6K-Protein deutlich gesenkt wird (Ren et al, 2012). In diesem Zusammenhang könnte möglicherweise ein Feedback-Mechanismus des Körpers ein Erklärungsansatz für die in der vorliegenden Arbeit gefundene Erhöhung der Genexpression von RPS6K1 durch Rapamycinzugabe sein. So wäre es ähnlich wie bei der Expression von mTOR selbst (siehe 5.1.3) denkbar, dass die deutliche Senkung der Anzahl an phosphorylierten und somit funktionsfähigen S6K-Proteinen im Körper zu einer reaktiven Steigerung der Genexpression im Sinne eines Kompensationsmechanismus führt.

6.3.3 mTOR

Auch bei mTOR waren die Ergebnisse der PCRs den beiden eingangs besprochenen Genen sehr ähnlich. Hier fand sich erneut eine signifikant erniedrigte Expression bei den undifferenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu denen aus Gesundem, welche sich jedoch ebenfalls durch Rapamycinzugabe stark steigern ließ. Dies spricht ebenfalls für eine deutliche Regulation der Gene des mTOR-Signalweges im erkrankten Gewebe.

Bei den differenzierten Zellen bestätigte sich erneut, dass das von MSL betroffene Gewebe hier sehr ähnliche Tendenzen aufweist wie Gesundes. Dies könnte wiederum ein Hinweis dafür sein, dass die Zellen auf Genebene im ausgereiften Zustand keine pathologischen Tendenzen mehr aufweisen.

Auch in anderen Gebieten, beispielsweise der Krebsforschung, gewinnt der mTOR-Signalweg zunehmend an Interesse. In diesem Zusammenhang ergab eine Studie mit 285 Brustkrebspatientinnen, dass eine Überexpression des phosphorylierten und somit aktivierten mTOR-Proteins mit einem auf das Dreifache erhöhten Rezidivrisiko einhergeht (Bose et al, 2006). In ähnlicher Weise haben auch immunhistochemische Untersuchungen gezeigt, dass eine Überexpression dieses Proteins mit einer verringerten rezidivfreien Überlebensrate vergesellschaftet ist (Zhou et al, 2004). Zwar handelt es sich bei dem von Morbus Madelung betroffenen Fettgewebe nicht um Tumorgewebe, jedoch liegen auch hier entartete Zellen mit deutlich erhöhten Proliferationsraten vor, was unter anderem an den Ergebnissen der Vitalitätstests gezeigt werden konnte. Die sich aus den PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit ergebende erniedrigte Genexpression von mTOR im erkrankten Gewebe, könnte möglicherweise Ausdruck eines negativen Feedback-Mechanismus des Körpers sein. So wäre es denkbar, dass die Überexpression des aktivierten mTOR-Proteins dazu beiträgt, die Genexpression von mTOR herunter zu regulieren. Analog hierzu könnte die Zugabe von Rapamycin diesen Effekt wieder aufheben, da dadurch die Aktivität des mTOR-Proteins und somit auch die der in der Signalkaskade folgenden Zielproteine blockiert wird. Hierdurch könnte möglicherweise die gefundene Hochregulation der Genexpression von mTOR durch Rapamycinzugabe erklärt werden.

6.4 Oil Red Färbung

Um beide Zellarten auch hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit zu untersuchen, wurden Oil Red Färbungen durchgeführt und die Menge des eingelagerten Farbstoffes quantifiziert. Dass die Differenzierung der Zellen über 21 Tage hinweg erfolgreich war, ließ sich an den deutlich niedrigeren Werten derjenigen Zellen, die lediglich mit Zellkulturmedium behandelt worden waren, zeigen. Diese konnten im Gegensatz zu den differenzierten Adipozyten weitaus weniger Farbstoff einlagern, da sie kaum Lipidtröpfchen gebildet hatten.

Insgesamt waren die Zellen aus erkranktem Gewebe dazu fähig sich zu differenzieren und Lipidtröpfchen zu bilden, allerdings lagen ihre Werte deutlich unter denen der Zellen aus gesundem Gewebe. Diese scheinen sich also unter gleichen Bedingungen besser zu ausgereiften Adipozyten entwickeln zu können. Durch Rapamycinzugabe ließ sich bei den Zellen aus unbetroffenem Gewebe nur eine leichte Senkung der ausgewaschenen Farbstoffmenge beobachten, bei denen aus erkranktem Gewebe waren die Veränderungen noch geringer. Folglich hat eine Blockade des mTOR-Signalweges zwar sehr wohl Auswirkungen auf Vitalität und Proliferation der Zellen, jedoch nur in geringem Maße auf deren Differenzierungsfähigkeit. Hier scheinen sich die Zellen aus betroffenem Gewebe denen aus Gesundem immer stärker anzunähern, wenngleich die Ausprägung ihres Differenzierungsgrades unter derer der gesunden Zellen liegt. Dies lässt sich auch gut mit den Ergebnissen aus den PCRs vereinen, da sich hier sehr wohl größere Unterschiede hinsichtlich der Genexpression bei den undifferenzierten Zellen finden ließen, während die Ergebnisse bei den differenzierten Zellen sehr ähnliche Tendenzen aufgewiesen haben.

Der Effekt von Rapamycin auf die Adipogenese wurde auch in einer experimentellen Arbeit des Ottawa Health Research Institute untersucht, wobei das Hauptaugenmerk auf der Insulin-Signalkaskade und der hierdurch induzierten Differenzierung von Adipozyten lag. Da mTOR ein Substrat der Proteinkinase B ist, welche eine Rolle in der Insulin-Signalkaskade spielt und zudem seinerseits p70 S6K und EIF4EBP1 reguliert, wurde auch der Effekt von Rapamycin auf deren Aktivität untersucht. Zunächst wurden die Zellen hierzu mit einem ähnlichen Differenzierungsmedium wie in der vorliegenden Arbeit behandelt, welches Insulin, Dexamethason und IBMX enthielt und anschließend unter anderem Oil Red Färbungen durchgeführt. Dabei konnte auch in dieser Arbeit die Beobachtung gemacht werden, dass eine Blockade des mTOR-Signalweges die Differenzierung von Präadipozyten zu vollständig ausgereiften Fettzellen zumindest nur teilweise inhibiert. Daraufhin wurde die durch Insulin

stimulierbare Aktivität von p70 S6K und EIF4EBP1 anhand deren Phosphorylierung untersucht, wobei sich eine vollständige Blockade der Aktivität von p70 S6K ergab. EIF4EBP1 hingegen konnte in seiner Aktivität nur teilweise gehemmt werden, was in Zusammenschau mit der ebenfalls nur partiellen Blockade des Differenzierungsvorgangs bei Präadipozyten durch Rapamycin ein Hinweis darauf sein könnte, dass dieser Faktor eine wichtige Rolle bei der Adipogenese spielt (El-Chaar et al, 2004). Auch eine weitere experimentelle Studie, in der Knock-out-Mäuse ohne EIF4EBP1 untersucht wurden, kann diese Beobachtungen stützen, da die Mäuse ohne dieses Protein nur in geringerem Maße dazu in der Lage waren Fettgewebe zu bilden, was ebenfalls eine Rolle bei der Adipogenese vermuten lässt (Tsukiyama-Kohara et al, 2001). Hierdurch wäre auch der in der vorliegenden Arbeit beobachtete nur geringe Effekt von Rapamycin auf die Differenzierung der behandelten Zellen erklärbar, welcher auf die lediglich partielle Blockade der Aktivität von EIF4EBP1 durch Rapamycin zurückgeführt werden könnte.

6.5 Lipolyse-Assays

Bei den Lipolyse-Assays konnte zunächst beobachtet werden, dass bei Stimulation durch cAMP deutlich mehr Triglyceride aus den Zellen freigesetzt wurden als durch Isoprotenerol. Dies könnte daran liegen, dass die Zelle über cAMP direkt stimuliert werden kann, während eine Katecholaminzugabe immer erst über einen Umweg am β -Adrenorezeptor wirken kann, wodurch im weiteren Verlauf erst über die Aktivierung der Adenylazyklase der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt, welcher letztlich die Lipolyse induziert. Es wäre allerdings auch möglich, dass durch eine Konzentrationssteigerung des Isoprotenerols ähnliche Lipolyseraten erzielt werden könnten wie durch cAMP.

Auffällig war auch, dass die Zellen aus erkranktem Gewebe bei beiden Induktoren ähnliche oder sogar noch höhere Mengen an Lipiden freigesetzt haben als die Zellen aus gesundem Gewebe. Dies scheint zunächst im Widerspruch zur Pathophysiologie bei Morbus Madelung zu stehen, da hier eher von einer verringerten Lipolyseaktivität im erkrankten Gewebe auszugehen wäre. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass die Zellen im betroffenen Gewebe offenbar eher die Tendenz zur verstärkten Proliferation und verringerter Differenzierung besitzen. Dies spiegelt sich auch gut in den Ergebnissen der Resazurin-Tests wider. Da die Einlagerung von Lipiden bei Adipozyten mit einem fortgeschrittenen Differenzierungsgrad

einhergeht, wäre es möglich, dass die Zellen aus erkranktem Gewebe eher die Tendenz besitzen, Triglyceride abzugeben um sich in einen Zustand zurückzusetzen, der proliferative Vorgänge begünstigt und sich vom vollständig ausdifferenzierten Zustand eher distanziert. Man könnte also zumindest von einer teilweisen Dedifferenzierung der Zellen im Madelunggewebe sprechen. Dieses Phänomen konnte in manchen Organismen bereits nachgewiesen werden und kann in vereinzelten Fällen sogar bis zur Wiedererlangung der Totipotenz führen. So kann beispielsweise aus abgeschnittenen Trieben vieler Pflanzenarten eine völlig neue und eigenständige Pflanze erwachsen (Mitalipov et Wolf, 2009). Auch die Beobachtung, dass Zellen aus von MSL betroffenem Gewebe kleiner sind als Adipozyten aus gesundem Gewebe (Enzi et al., 1977), lässt sich gut mit der These vereinen, dass diese Zellen eher die Tendenz haben, eingelagerte Lipide schneller wieder freizusetzen.

Eine weitere Beobachtung war, dass bei den Zellen aus beiden Gewebearten und bei beiden Induktoren die Lipolyseaktivität mit steigenden Rapamycinkonzentrationen stufenweise abfiel. Eventuell könnte hier eine Parallele zu einer weiteren Blockademöglichkeit des mTOR-Signalweges bestehen. Denn neben Rapamycin wird dieser auch durch Nahrungskarenz inhibiert (Harrison et al., 2009). Bei Kalorienrestriktion greift der Körper zwar zunächst vermehrt auf seine Fettreserven zurück, allerdings stellt er sich im weiteren Verlauf auf das verringerte Nahrungsangebot ein und ist bestrebt, seine Reserven zurückzuhalten und den Verbrauch zu drosseln. Da sowohl Nahrungskarenz als auch Zugabe von Rapamycin mit einer Blockade des mTOR-Signalweges einhergehen, liegt die Vermutung nahe, dass Rapamycin ähnliche Effekte wie eine Nahrungsrestriktion haben könnte. Ähnliche Schlüsse können auch aus einer Studie gezogen werden, in welcher eine Gruppe von Mäusen einer Rapamycin-haltigen Diät unterzogen und anschließend mit einer Kontrollgruppe verglichen wurde. Bei den exponierten Mäusen fanden sich, ähnlich wie bei einer Diät, eine durchschnittliche Reduktion des Körpergewichts um 58%, eine Verringerung des Körperfettanteils um 33% und ein niedrigerer Gehalt an freien Fettsäuren als in der Kontrollgruppe. Auch konnte bei Zusatz von Rapamycin zum Futter der Tiere eine erhöhte Insulinsensitivität nachgewiesen werden, einem Hormon, welches die Lipolyse hemmt (Deepa et al, 2013). Diese Beobachtung ist im Zusammenhang mit der hier vorliegenden Arbeit besonders interessant, da das adipogene Differenzierungsmedium, mit welchem die Zellen über drei Wochen hinweg behandelt wurden, Insulin enthält. Auch hier könnte durch Rapamycinzugabe die Sensitivität der Zellen gegenüber Insulin gestiegen sein und somit auch dessen hemmende Effekte auf die Lipolyse. Hierdurch wäre unter anderem die beobachtete verringerte Lipolyseaktivität bei Zugabe des Immunsuppressivums gut zu erklären.

7. Schlussfolgerung

Durch die vorliegende Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellen aus von MSL betroffenem Gewebe eine deutlich höhere Vitalität aufweisen als diejenigen aus gesundem Gewebe und sich in ihrer Genexpression sowohl bei Zielgenen des mTOR-Signalweges als auch bei Genen inmitten der Transduktionskaskade deutlich unterscheiden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Blockade durch Rapamycin die Zellvitalität und Proliferation signifikant hemmt und die Genexpression von Genen des mTOR-Signalweges im erkrankten Gewebe deutlich erhöht. Diese Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen den pathophysiologischen Vorgängen auf Zellebene bei Morbus Madelung und einer Störung im mTOR-Signalweg schließen.

Aufgrund der Tatsache, dass es derzeit keine kausalen Therapieoptionen für Morbus Madelung gibt und die symptomatische chirurgische Resektion häufig mit Reziden einhergeht, wäre die Fragestellung interessant, ob Rapamycin in Zukunft für diese Patienten eine alternative, nicht-invasive Therapiemöglichkeit darstellen könnte. Da in dieser Arbeit eine deutliche antiproliferative Wirkung des Medikaments auf Madelungszellen nachgewiesen werden konnte und auch im Tiermodell an Mäusen eine deutliche Reduktion des Gesamtkörperfettanteils nachgewiesen werden konnte (Deepa et al, 2013), könnten hier weitere Untersuchungen von Interesse sein. So wäre beispielsweise eine genauere Erforschung des Nebenwirkungsprofils von Rapamycin, besonders im Hinblick auf seine immunsuppressive Wirkung, und auch verschiedener Applikationsformen denkbar. Da lokale Anwendungen in der Regel mit geringeren Nebenwirkungen einhergehen als systemische, könnte dies einen interessanten Punkt für weitere Untersuchungen im Tiermodell darstellen. Alle diese Aspekte könnten zur weiteren Klärung der Fragestellung beitragen, ob Rapamycin in Zukunft im klinischen Alltag bei Madelungpatienten Anwendung finden und diesen somit als nicht-invasive Behandlungsoption zu Gute kommen könnte.

8. Literaturverzeichnis

- Abizaid, A. (2007). Sirolimus-eluting coronary stents: a review. *Vasc Health Risk Manag*, 3(2): 191–201.
- Akcakanat, A., Zhang, L., Tsavachidis, S. and Meric-Bernstam, F. (2009). The rapamycin-regulated gene expression signature determines prognosis for breast cancer. *Molecular Cancer*, 8: 75.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425: 968–973.
- Ashjian, P. H., Elbarbary, A.S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P.A., Lorenz, H.P., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg.*, 111: 1922-31.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J.C. and Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*, 109: 12.
- Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S.M., Finato, N., Bussani, R., Nadal Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C.A. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New Engl. Jour. of Med.*, 344: 1750–1757.
- Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., and Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.
- Bose, S., Chandran, S., Mirocha, J.M. and Bose, N. (2006). The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol.*, 19: 238-245.
- Brandt, I. (2011). Untersuchung der Proliferationshemmung von Brustkrebszellen durch das Bioflavonoid Quercetin in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290: 1775–1779.
- Brodie, B.C. (1846). Lectures illustrative of various subjects in pathology and surgery. Longman: London, 275-276.
- Bunnell, A.B., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. and Ripoll, C. (2008). Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods*, 45(2): 115–120.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9: 641–650.
- Chen, K., Xie, Y., Hu, P., Zhao, S., Mo, Z. (2010). Multiple symmetric lipomatosis: substantial subcutaneous adipose tissue accumulation did not induce glucose and lipid metabolism dysfunction. *Ann. Nutr. Metab*, 57: 68-73.

Cohade, C., Osman, M., Leal, J., Wahl, R.L. (2003). Direct comparison of (18)F-FDG PET and PET/CT in patients with colorectal carcinoma. *J. Nucl. Med.*, 44: 1789–1796.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E. L., Tseng, Y.H., Doria, A., Kolodny, G.M., Kahn, C.R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.*, 360: 1509–1517.

Deepa, S.S., Walsh, M.E., Hamilton, R.T., Pulliam, D., Shi, Y., Hill, S., Li, Y. and Van Remmen, H. (2013). Rapamycin Modulates Markers of Mitochondrial Biogenesis and Fatty Acid Oxidation in the Adipose Tissue of db/db Mice. *J Biochem Pharmacol Res.*, 1(2): 114–123.

Deslex, S., Negrel, R., Vannier, C., Etienne, J., Ailhaud, G. (1987). Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int.J.Obes.*, 11: 19–27.

Deutsches Ärzteblatt (07/2009). Rapamycin lässt Mäuse länger leben.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-7.

Donhauser G., Vieluf D., Ruzicka T., Braun-Falco O. (1991). Benigne symmetrische Lipomatose Launois-BensaudeTyp III und Bureau-Barriere-Syndrom. *Hautarzt*, 42: 311-314.

El-Chaar, D., Gagnon, A., Sorisky, A. (2004). Inhibition of insulin signaling and adipogenesis by rapamycin: effect on phosphorylation of p70 S6 kinase vs eIF4E-BP1. *International Journal of Obesity* 28(2): 191-8.

Enzi, G., Inelmen, E.M., Baritussio, A., Dorigo, P., Prosdocimi, M., Mazzoleni, F. (1977). Multiple Symmetric Lipomatosis - A Defect in Adrenergic-Stimulated Lipolysis. *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 60: 1221-1229.

Enzi, G., Busetto, L., Ceschin, E., Coin, A., Digito, M., Pigozzo S. (2002). Multiple symmetric lipomatosis: clinical aspects and outcome in a long-term longitudinal study. *International Journal of Obesity*, Volume 26(2): 253-261.

Enzi, G., Busetto, L., Sergi, G., Coin, A., Inelmen, E.M., Vindigni, V., Bassetto, F., Cinti, S. (2015). Multiple symmetric lipomatosis: a rare disease and its possible links to brown adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 25(4): 347-53.

Esteban-Julvez, L., Perello-Aragones, S., Aguilar-Bargallo, X. (2013). Sleep apnea-hypopnea syndrome and multiple symmetrical lipomatosis. *Archivos de Bronconeumología*, vol. 49(2): 86–87.

Felthaus, O. (2014). Die Rolle des Transkriptionsfaktors ZBTB16 bei der osteogenen Differenzierung dentaler Follikelzellen.

Fonseca, V.R., Freitas, C., Palmeira, M., Ferreira, C., Victorino, R. (2012). Cardiac noradrenergic denervation in a patient with multiple symmetric lipomatosis. *Cardiology*, 121(3): 160-3.

Foster, D.O., Frydman, M.L. (1979). Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 57: 257–270.

Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., Jiang, X. (2009). ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, 284: 12297-12305.

Gimble, J.M. (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.*, 3: 705–713.

Gimble, J.M., Guilak, F. (2003). Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 58: 137–160.

Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R. and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13:1422–1437.

Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N. (2001a). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*, 15: 807–826.

Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszyńska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N. (2001b). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*, 15: 2852–2864.

Guertin, D.A., Sabatini, D.M. (2007). Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*, 11-12.

Guilak, F., Lott, K.E., Awad, H.A., Cao, Q., Hicok, K.C., Fermor, B., Gimble, J.M. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.*, 206: 229–237.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401: 390–394.

Hadjiev, B., Stefanova, P., Shipkov, C., Uchikov, A. and Mojallal, A. (2010). Madelung disease: on the morphologic criteria for diagnosis and treatment. *Annals of Plastic Surgery*, vol. 64(6): 807–808.

Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., Pahor, M., Javors, M.A., Fernandez, E., Miller, R.A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460: 392-395.

Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., Pfeiffer, E.F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J. Clin. Invest.*, 84: 1663–1670.

Hauxberger, F.X. (1964). Neurogenic factors affecting adipose tissue metabolism. In *Fat as a Tissue*. K. Rodahl and B. Issekutz, editors. McGraw-Hill, New York: 239-249.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell*, 20: 1981-1991.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.*, 6: 1122-1128.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., Kim, D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell*, 20: 1992-2003.

Kim, J.E. and Chen, J. (2004). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*, 53: 2748-2756.

Ko, M.J. and Chiu, H.C. (2010). Madelung's disease and alcoholic liver disorder. *Hepatology*, vol. 51(4): 1466–1467.

Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 10711–10716.

Kortelainen, M.L., Pelletier, G., Ricquier, D., Bukowiecki, L.J. (1993). Immunohistochemical detection of human brown adipose tissue uncoupling protein in an autopsy series. *J. Histochem. Cytochem.*, 41: 759–764.

Kotton, D.N., Fine, A. (2003). Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. *Cytherapy*, 5: 169–73.

Kurzweg F.T., Spencer S.L. (1951). Familial multiple lipomatosis. *Am J Surg*, 82: 762-765.

Laplane, M., Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at glance.

Launois, P.E., Bensaude R. (1898). De l'adeno-lipomatose symmetrique. *Bull Mem Soc Med Hôp*, 1: 298.

Levesque, J.B., Takamatsu, Y., Hilsson, S.K., Haylock, D.N., Simmons, R.J. (2001). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor. *Blood*, 98: 1289–1290.

Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J.,

Bouvy, N.D., Schrauwen, P., Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 360: 1500–1508.

Madelung, O.W. (1888). Über den fetthals (diffuses lipom des halses). *Archiv Für Klinische Chirurgie*, 37: 106-130.

Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129: 1261-1274.

McKusik, V.A. (1978). Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. 5th edn. John Hopkins University Press: Baltimore, MD: 242-243.

Michon P. (1936). Adenolipomatose symmetrique familiale. *Press Med.*, 44: 663-669.

Milisavljevic, D., Zivic, M., Radovanović, Z. and Stankovic, P. (2010). Severe dyspnea as atypical presenting symptom of Madelung's disease. *Hippokratia*, vol. 14(2): 133–135.

Mitalipov, S. et Wolf, D. (2009). Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv. Biochem Eng Biotechnol.*, 114: 185–199.

Morales, J.M., Wramner, L., Kreis, H., Durand, D., Campistol, J.M., Andres, A., Arenas, J., Negre, E., Burke, J.T., Groth, C.G. (2002). Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal transplant recipients. *Am J Transplant.*, 2(5): 436-42.

Moritsch, E. (2004). Vorkommen und Therapie des Madelung'schen Fetthalses (Benigne beidseitige Lipomatose). *Ars Medici*, 22: 1131.

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1504: 82–106.

Nicholls, D.G., Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.*, 64: 1-64.

Nielsen, S., Levine, J., Clay, R., Jensen, M.D. (2001). Adipose tissue metabolism in benign symmetric lipomatosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 2717-2720.

Nisoli, E., Regianini, L., Briscini, L., Bulbarelli, A., Busetto, L., Coin, A., Enzi, G., Carruba, M.O. (2002). Multiple symmetric lipomatosis may be the consequence of defective noradrenergic modulation of proliferation and differentiation of brown fat cells. *J. Pathol*, 198: 378-387.

Noh, W., Mondesire, W.H., Peng, J., Jian, W., Zhang, H., Dong, J., Mills, G.B., Hung, M., Meric-Bernstam, F. (2004). Determinants of Rapamycin Sensitivity in Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 3: 43.

Park, I.H., Bachmann, R., Shirazi, H., Chen, J. (2002). Regulation of ribosomal S6 kinase 2 by mammalian target of rapamycin. *J. Biol. Chem.*, 277: 31423-31429.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284: 1168–1170.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143–147.

Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J.R., Chung, Y. L., Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 8: 224-236.

Prant, L., Schreml, J., Gehmert, S., Klein, S., Bai, X., Zeitler, K., Schreml, S., Alt, E., Gehmert, S., Felthaus, O. (2015). Transcription profile in sporadic multiple symmetric lipomatosis reveals differential expression at the level of adipose tissue derived stem cells.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71–74.

Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, J., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D., Chalivendra, S., Logan, D., Mattoo, A., Selvaraj, G., Datla, R. (2012). Target of Rapamycin Signaling Regulates Metabolism, Growth, and Life Span in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24(12): 4850–4874.

Rial, E., Nicholls, D.G. (1984). The mitochondrial uncoupling protein from guinea-pig brown adipose tissue. Synchronous increase in structural and functional parameters during coldadaptation. *Biochem. J.* 222: 685-693.

Ricquier, D., Bouillaud, F., Toumelin, P., Mory, G., Bazin, R., Arch, J., Pénicaud, L. (1986). Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J. Biol. Chem.* 261: 13905-13910.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.*, 14: 1296-1302.

Sehgal, S.M. (2003). Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.*, 35(3): 7-14.

Sia, K.J., Tang, I.P., Tan, T.Y. (2012). Multiple symmetrical lipomatosis: case report and literature review. *The Journal of Laryngology & Otology*, vol. 126(7): 756–758.

Terskikh, A.V., Easterday, M.C., Li, L., Hood, L., Kornblum, M.K., Geschwind, D.H., Weissman, I.L. (2001). From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 7934–7939.

Tsukiyama-Kohara, K., Poulin, F., Kohara, M., DeMaria, C.T., Cheng, A., Wu, Z., Gingras, A.C., Katsume, A., Elchebly, M., Spiegelman, B.M., Harper, M.E., Tremblay, M.L., Sonenberg, N. (2001). Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med.*, 7: 1128–1132.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S., Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.*, 360: 1553–1556.

Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.M., Moonen, G., Rogister, B. (2005). Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. *STEM CELLS*, 23: 392-402.

Woodbury, D., Reynolds, K., Black, I.B. (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.*, 96: 908–917.

Zhou, X., Tan, M., Stone Hawthorne, V., Klos, K.S., Lan, K.H., Yang, Y., Yang, W., Smith, T.L., Shi, D., Yu, D. (2004). Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res.*, 10: 6779-6788.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.L., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.*, 13: 4279–4295.

9. Materialienverzeichnis

9.1 Einwegmaterialien

ECO Plates 48 well (Cat. No. Deutschland EC200-1002)	Amplifa Labortechnik GmbH, Wasserburg,
ECO Adhesive Seals (Cat. No. Deutschland EC200-1003)	Amplifa Labortechnik GmbH, Wasserburg,
Multiwellplatten (96-, 24-, 6-) GmbH,	Advanced TC™ Plate, Cellstar Greiner Bio-One Frickenhausen VWR International GmbH, Darmstadt,
Parafilm (Cat. No. 291-1213) Deutschland Pipettenspitzen, gestopft Serologische Pipettenspitzen (2ml, 5ml, 10 ml, 25ml, 50ml) Round-Bottom-Tubes (FACS) Canaan,	Biosphere plus, Nümbrecht, Deutschland Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen BD Biosciences Discovery Labware Falcon™,
SteriflipFilter Zellkulturflaschen (T75, T175) Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml; Cat. No. 62554502; 227261)	USA Millipore Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

9.2 Chemikalien

α -MEM Eagle (Cat. No. M4526) β -Mercaptoethanol (Cat. No. M7522-100ML) BSA (Cat. No. A3059-506) cAMP (Cat. No. D0627-25MG) Collagenase from Clostridium histolyticum (Cat. No. C8176-100MG) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Cat. No. D8417-5MG) Dexamethason (Cat. No. 86,187-11) Dibutryl cAMP sodium salt (Cat. No. D0627-25MG) DMEM, low glucose (Cat. No. 31885-023) DMSO (Dimethylsulfoxid, Cat. No. D5879-100ML) EDTA (Cat. No. ED-1KG) Ethanol (Cat. No. 9065.4) FBS (Fetal Bovine Serum; Cat. No. P30-3302) GlutaMAX (Cat. No. 35050-038) IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine,	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Life Technologies, Carlsbad, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland Invitrogen, Carlsbad, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
---	--

Cat. No. I5879-250MG)	
Indomethacin (Cat. No. I7378)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin solution human (Cat. No. I9278-5ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Master Mix 2x DyNAmo Color Flash (Cat. No. F-416XL)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Methanol (Cat. No. 1.06007.2500)	MERCK Millipore, Darmstadt, Deutschland
NaN ₃ (Natriumazid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oil Red O (Cat. No. O0625.25G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (Cat. No. 158127-500G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS (Phosphate buffered saline; Cat. No. P3813-10PAK)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin (P0781-100ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol (Cat. No. 1.09634.1011)	MERCK Millipore, Darmstadt, Deutschland
Rapamycin (Cat. No. R0395-1MG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin, 0,7 mM (Cat. No. R7017)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase A (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA 1x (Cat. No. P10-023100)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

9.3 Kits

Lipolysis (3T3-L1) Colorimetric Assay Kit (Cat. No. K577-100)	Bio Vision, Milpitas, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit (Cat. No. 205310)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rneasy Mini Kit (250) (Cat.No. 74106)	Qiagen, Hilden, Deutschland

9.4 Geräte

Brutschrank (HERA cell 240)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer (BD FACSCANTO II)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
ECO Real-Time PCR Gerät	Illumina, San Diego, USA
Einfrierbehälter	NALGENE, New York, USA
Lichtmikroskop	Leica WETZLAR, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Orbitalschüttler (Polymax 2040)	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	eppendorf Reference, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Plattenphotometer Varioskan Flash	Thermo Scientific, Waltham, USA
Schüttelinkubator	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Spektralphotometer Nano Drop 2000c	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	Schulz Lufttechnik GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Vortexer (Combi-SPIN FVL-2400)	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Wasserbad	memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 380R)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fotos von Patienten mit den unterschiedlichen Subtypen des Morbus Madelung vom

Universitätsklinikum Regensburg aus den Abteilungen der Plastischen, Hand- und

Wiederherstellungschirurgie und der Dermatologie

Abbildung 2: Zellteilung und Differenzierung von Stammzellen

Abbildung 3: Das Differenzierungspotential von Stammzellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien

Abbildung 4: Relative Genexpression von EIF4EBP1

Abbildung 5: Relative Genexpression von RPS6K1

Abbildung 6: Relative Genexpression von mTOR

Abbildung 7: normalisierte Zellvitalität, gemessen 48 Stunden nach Rapamycinzugabe und nach 2-

stündiger Inkubation mit Resazurin

Abbildung 8: Ergebnisse der Durchflusszytometrie exemplarisch für einen Patienten. Y-Achse:

Anzahl an erfassten Zellen

Abbildung 9: prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen nach 24-stündiger Behandlung mit Rapamycin

Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Oil Red Färbung von Adipozyten eines Patienten nach 3-wöchiger adipogener Differenzierung

Abbildung 11: normalisierter Differenzierungsgrad nach 3-wöchiger adipogener Differenzierung

Abbildung 12: Lipolyseaktivität der Zellen aus gesundem und erkranktem Gewebe

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer

11. Abkürzungsverzeichnis

AKT1	PKB (Proteinkinase B)
ATG13	autophagy-related gene 13
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
eIF4E	eucaryontic translation initiation factor 4E
EIF4EBP1	eucaryontic translation initiation factor 4E-Bindeprotein 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
MSL	Multiple Symmetrische Lipomatose
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of Rapamycin
mTORC1	mammalian target of Rapamycin-Komplex 1
mTORC2	mammalian target of Rapamycin-Komplex 2
PDCD4	programmed cell death protein 4
PPAR γ	peroxosome proliferator-activated-receptor γ
PRDM16	PR domain containing 16
RPS6K1	ribosomal protein S6 kinase 1
SREBP1	sterol regulatory element binding protein 1
TMEM26	transmembrane protein 26
UCP-1	uncoupling protein 1
ULK1	unc-51-like kinase1

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Teresa Schön
Geurtsdatum: 08.11.1991
Geburtsort: München
Anschrift: Engelsdorf 1
93482 Pemfling
teresa.schoen@web.de
Eltern: Robert Bübl, *21.09.1955, Dermatologe
Beate Schön, *24.02.1958, Dermatologin

Schulbildung:

09/1998-07/2002: Besuch der Grundschule in 93482 Pemfling

09/2002-03/2011: Besuch des Joseph-von Fraunhofer-Gymnasiums in 93413 Cham

Studium:

10/2011-07/2013: Studium der Humanmedizin im Vorklinischen Abschnitt an der Universität
Regensburg

08/2013: 1. Staatsexamen der Humanmedizin

10/2013-07/2016: Studium der Humanmedizin im Klinischen Abschnitt am
Universitätsklinikum

Regensburg

10/2016: 2. Staatsexamen der Humanmedizin

Famulaturen:

02-03/2014: Allgemeinmedizin in der Hausarztpraxis Dr. König-Huber, Nittenau

08/2014: Plastische Chirurgie am Caritas St. Josef Krankenhaus in Regensburg bei Prof.
Dr.

Prantl

08/2015: Dermatologie in der Hautarztpraxis Dr. Steiger, Starnberg

02-03/2016: Anästhesie am Universitätsklinikum Regensburg

Praktisches Jahr:

11/2016 – 03/2017: Abteilungen für Unfall-, Allgemein- und Gefäßchirurgie am Klinikum Weiden

03-06/2017: Innere Medizin am Klinikum Barmherzige Brüder in Regensburg

07-10/2017: Dermatologie am Universitätsklinikum Regensburg

13. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. med. Lukas Prantl möchte ich mich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Labore sowie sämtlicher Geräte und die Finanzierung der Verbrauchsmaterialien danken, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich ihm für seine Gutachtertätigkeit danken. Bei Herrn Dr. Oliver Felthaus möchte ich mich für die gute Einarbeitung im Labor, die Hilfestellung bei der Planung und Durchführung sämtlicher Versuche und die stetige Unterstützung während allen Phasen der Arbeit danken. Des Weiteren danke ich ihm für seine stete Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und der hierauf basierenden Weiterentwicklung der Arbeit. Bei Frau Bernadette Fühnstein und bei Frau Elke Gerstl möchte ich mich ebenfalls für die freundliche Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung aller Versuche bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern des Zentrums für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg für die freundliche Unterstützung der Arbeit, insbesondere für die Bereitstellung von Lipoaspirat und solidem Fettgewebe aus chirurgischen Eingriffen. Ganz besonders möchte ich in diesem Rahmen natürlich allen Patienten danken, die sich bereit erklärt haben, an der Studie teilzunehmen und ihr Fettgewebe für die Isolation der Stammzellen zur Verfügung zu stellen.

14. Erklärung

Ich, Teresa Angela Schön, geboren am 08.11.1991 in München, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 15.05.2018

.....